

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

Roberta Passinato

**EMPREGO DE ULTRASSOM NA FABRICAÇÃO DE LEITE EM PÓ
COM ADIÇÃO DE PROBIÓTICOS**

Santa Maria, RS, Brasil
2018

Roberta Passinato

**EMPREGO DE ULTRASSOM NA FABRICAÇÃO DE LEITE EM PÓ COM ADIÇÃO
DE PROBIÓTICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de concentração em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientador: Prof. Alexandre José Cichoski
Co-orientador: Prof. Cristiano Ragagnin de Menezes

Santa Maria, RS, Brasil
2018

Passinato, Roberta

Emprego de ultrassom na fabricação de leite em pó com
adição de probióticos / Roberta Passinato.- 2018.
96 p.; 30 cm

Orientador: Alexandre José Cichoski

Coorientador: Cristiano Ragagnin de Menezes

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2018

1. ultrassom 2. leite 3. probióticos 4. temperatura 5.
vida de prateleira I. Cichoski, Alexandre José II.
Ragagnin de Menezes, Cristiano III. Título.

Roberta Passinato

**EMPREGO DE ULTRASSOM NA FABRICAÇÃO DE LEITE EM PÓ COM ADIÇÃO
DE PROBIÓTICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de concentração em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Aprovado em 06 de setembro de 2018:

Alexandre José Cichoski, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Cristiano Ragagnin de Menezes, Dr. (UFSM)
(Co-orientador)

Carla Cristina Bauermann Brasil, Dra. (UFSM)

Larissa Alves, Dra. (IFFar – Panambi/RS)

Santa Maria, RS
2018

RESUMO

EMPREGO DE ULTRASSOM NA FABRICAÇÃO DE LEITE EM PÓ COM ADIÇÃO DE PROBIÓTICOS

AUTORA: Roberta Passinato

ORIENTADOR: Alexandre José Cichoski

CO-ORIENTADOR: Cristiano Ragagnin Menezes

O leite e seus derivados são alimentos de grande consumo no mundo, e assim movimentam grande parte das indústrias processadoras na busca de inovações tecnológicas, visando melhorias na qualidade dos produtos e eficiência em seus processos produtivos. Sendo assim, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos da aplicação de ultrassom (US) a 25 kHz de frequência em diferentes amplitudes e modos de operação (*sweep* e *normal*) em leite integral concentrado através das análises de acidez, viscosidade, pH, insolubilidade e luminosidade para posteriormente definir a melhor maneira de tratar o leite para submetê-lo ao processo de *spray dryer*. Definida a melhor condição, submeteu-se o leite concentrado ao *spray dryer*, adicionado ou não de probióticos *Lactobacillus rhamnosus*. O leite em pó fabricado foi estocado a 25, 35 e 45°C e avaliado por 120 dias em relação à atividade de água, umidade e cor. O leite reconstituído foi avaliado em relação à acidez, pH, insolubilidade, composição (gordura, proteína, caseína e lactose), eficiência de encapsulação e contagem de bactérias lácticas. O US aplicado em leite concentrado, no modo de operação normal, demonstrou diminuição dos valores de acidez e viscosidade. No leite em pó resultou melhorias na homogeneização e no crescimento de bactérias lácticas. O US promoveu aceleração do escurecimento das amostras armazenadas a 45°C. Aw e umidade aumentaram em todos os tratamentos durante o período de armazenamento, mais expressivamente a 45°C, onde se observou elevados valores de insolubilidade, diminuição dos valores de luminosidade e pH. O leite reconstituído que foi submetido ao US apresentou teores de proteína, caseína e lactose mais baixos do leite reconstituído que não foi tratado. Com a embalagem empregada (constituída de uma camada de polietileno de baixa densidade, uma camada de adesivo e uma camada de poliéster metalizado, camada externa) de 75 micras de espessura a estimativa de vida de prateleira a 25°C, 35°C e 45°C foi de 127, 55 e 17 dias para o tratamento AB; para as amostras com US e com probióticos foi de 145, 53 e 15 dias e para as amostras sem US e com probióticos foi de 150, 54 e 21 dias. Sugere-se realização de novas pesquisas com novos tipos de embalagens e parâmetros de US, além de diferentes parâmetros de qualidade de leite em pó e utilização de valores recomendados como terapêuticos de probióticos em leite reconstituído.

Palavras-chave: ultrassom, leite, probióticos, armazenagem, temperatura, vida de prateleira.

ABSTRACT

ULTRASOUND EMPLOYMENT IN THE POWDER MILK PRODUCTION WITH PROBIOTICS ADDITION

AUTHOR: Roberta Passinato
ADVISOR: Alexandre José Cichoski
CO-ADVISOR: Cristiano Ragagnin Menezes

Milk and derivatives are food of great consumption in the world, and thus move much of the processing industries in search of technological innovations, aiming at improvements in the quality of the products and efficiency in their productive processes. The objective of this study was to evaluate the effects of ultrasound at 25 kHz frequency in different amplitudes and modes of operation (sweep and normal) in concentrated whole milk through acidity, viscosity, pH, insolubility and brightness to later define the best way to treat the milk to submit it to the spray dryer process. Once the best condition was established, the concentrated milk was subjected to the *spray dryer*, with or without probiotics *Lactobacillus rhamnosus*. The manufactured milk powder was stored at 25, 35 and 45°C and evaluated for 120 days in relation to water, moisture and color activity. Reconstituted milk was evaluated for acidity, pH, insolubility, composition (fat, protein, casein and lactose), encapsulation efficiency and lactic acid bacterial counts. The US applied in concentrated milk, in the normal mode of operation, showed a decrease in the values of acidity and viscosity. In the milk powder resulted in improvements in the homogenization and growth of lactic bacteria. The US promoted acceleration of the darkening of the samples stored at 45°C. Aw and humidity increased in all treatments during the storage period, more expressively at 45°C, where high values of insolubility, decrease of the values of luminosity and pH were observed. Reconstituted milk submitted to the US showed lower protein, casein and lactose levels than untreated reconstituted milk. With the packaging used (consisting of a layer of low density polyethylene, one layer of adhesive and one layer of metallized polyester, outer layer) of 75 microns thickness the shelf life estimate at 25°C, 35°C and 45°C was 127, 55 and 17 days for AB treatment; for the US and probiotic samples was 145, 53 and 15 days and for the samples without US and with probiotics was 150, 54 and 21 days. It is suggested to conduct new research with new types of packaging and US parameters, in addition to different parameters of powdered milk quality and use of recommended values as probiotic therapeutics in reconstituted milk.

Key words: ultrasound, milk, probiotics, storage, temperature, shelf life.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Secção de um banho ultrassônico.	15
Figura 2 - Gráfico de Pareto para a variável acidez no modo de operação normal do US.	34
Figura 3 - Variação da acidez em relação à temperatura empregada durante o tratamento do US no modo normal de operação do ultrassom, fundamentada na equação quadrática.	35
Figura 4 - Gráfico de Pareto para a variável acidez no modo de operação <i>sweep</i>	36
Figura 5 - Gráfico de Pareto para a variável viscosidade no modo de operação normal do ultrassom.	38
Figura 6 – Variação da viscosidade em relação à diferentes valores de amplitude no modo normal de operação do ultrassom, fundamentada na equação quadrática.	41
Figura 7 - Gráfico de Pareto para a variável viscosidade no modo de operação <i>sweep</i> de operação do ultrassom.	41
Figura 8 - Gráfico de Pareto para a variável pH no modo de operação normal do ultrassom.	43
Figura 9 - Gráfico de Pareto para a variável pH no modo de operação <i>sweep</i> do ultrassom.	44
Figura 10 - Gráfico de Pareto para a variável insolubilidade no modo de operação normal do ultrassom.	47
Figura 11 - Gráfico de Pareto para a variável insolubilidade no modo de operação <i>sweep</i> do ultrassom.	48
Figura 12 - Gráfico de Pareto para a variável L^* no modo de operação normal do ultrassom.	50
Figura 13 - Gráfico de Pareto para a variável L^* no modo de operação <i>sweep</i> do ultrassom.	51
Figura 14 – Efeito da interação tempo com amplitude na luminosidade (L^*) do leite concentrado a 20% tratado a 25 kHz na temperatura 22,5°C no modo de operação <i>sweep</i> do ultrassom.	52
Figura 15 – Valores de a_w e umidade (%) de leite em pó integral obtido de diferentes tratamentos estocados a 25, 35 e 45°C a 76% UR durante o período de 120 dias. .	57
Figura 16 – Valores de L^* e pH do leite reconstituído oriundo dos diferentes tratamentos de leite em pó estocados a 25, 35 e 45°C durante os períodos de 1, 30, 60, 90 e 120 dias.	65
Figura 17 - Valores de a_w do leite em pó e insolubilidade (g) do leite reconstituído oriundo dos diferentes tratamentos de leite em pó estocados a 25 (A), 35 (B) e 45°C (C) durante os períodos de 1, 30, 60, 90 e 120 dias.	73
Figura 18 – Modelo cinético da alteração de umidade em leite em pó integral obtido de diferentes tratamentos (AB, LUS e SUS) armazenados a 25°C, 35°C e 45°C em 76% UR durante o período de 120 dias.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores utilizados no delineamento composto central rotacional (DCCR) com três variáveis.	23
Tabela 2 - Valores de acidez (°Dornic) nos diferentes tratamentos em que foi submetido o leite concentrado a 20% nos modos de operação normal e <i>sweep</i> no US a 25 kHz.	33
Tabela 3 - Valores de viscosidade (cP) nos diferentes tratamentos em que foi submetido o leite concentrado a 20% nos modos de operação normal e <i>sweep</i> do ultrassom a 25 kHz.....	37
Tabela 4 - Valores de pH nos diferentes tratamentos em que foi submetido o leite concentrado a 20% e nos modos de operação normal e <i>sweep do US a 25 kHz</i>	42
Tabela 5 - Valores de insolubilidade nos diferentes tratamentos em que foi submetido o leite concentrado a 20% nos modos de operação normal e <i>sweep</i> do ultrassom a 25 kHz.....	46
Tabela 6 - Valores de L* nos diferentes tratamentos em que foi submetido o leite concentrado a 20% nos modos de operação normal e <i>sweep</i> do ultrassom a 25 kHz.	49
Tabela 7 - Valores de aw e umidade de leite em pó integral obtidos de diferentes tratamentos e armazenados a 25, 35 e 45°C a 76% UR durante 120 dias.....	55
Tabela 8 - Valores de luminosidade (L*) de leite em pó integral obtido de diferentes tratamentos (AB, LUS e SUS) e armazenados a 25, 35 e 45°C durante 120 dias....	61
Tabela 9 - Valores de acidez e pH do leite reconstituído oriundo dos diferentes tratamentos de leite em pó estocados a 25, 35 e 45°C durante 120 dias.	68
Tabela 10 - Valores insolubilidade do leite reconstituído oriundo dos diferentes tratamentos de leite em pó estocados a 25, 35 e 45°C durante 120 dias.	70
Tabela 11 - Valores de gordura e lactose em leites reconstituídos oriundos dos diferentes tipos de tratamentos em que foram submetidos e estocados a 25, 35 e 45°C durante 120 dias.....	75
Tabela 12 - Valores de proteína e caseína do leite reconstituído oriundo dos diferentes tratamentos de leite em pó estocados a 25, 35 e 45°C durante 120 dias.	78
Tabela 13 – Viabilidade do método <i>spray dryer</i> como agente encapsulante e eficiência da encapsulação de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> em leite concentrado e leite reconstituído sob diferentes tratamentos.	80
Tabela 14 – Número de colônias de bactérias lácticas (log UFC/mL) em leite reconstituído oriundo de leites em pó submetido a diferentes tratamentos armazenados durante 120 dias a 25, 35 e 45°C.	83
Tabela 15 – Estimativa de tempo de vida de prateleira de leites em pó obtidos de diferentes tratamentos estocados a 25°C e 35°C em 76% UR.	86
Tabela 16 – Energia de ativação nos diferentes tipos de leites em pó elaborados. ...	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Leite sem probióticos e sem ultrassom
Aw	Atividade de água
L*	Luminosidade
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
SCI	Componente especular incluso
SUS	Leite com probióticos e sem ultrassom
TPO ₂	Taxa de permeabilidade ao oxigênio
TAVP	Teste Acelerado de Vida de Prateleira
TPVA	Taxa de permeabilidade ao vapor d' água
US	Ultrassom
LUS	Leite com probióticos e com ultrassom

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 LEITE E DERIVADOS LÁCTEOS	13
2.2 ULTRASSOM (US)	14
2.2.1 Viscosidade	16
2.2.2 Glóbulos de gordura	16
2.2.3 Solubilidade das proteínas	17
2.2.4 Açúcares	18
2.2.5 Microbiologia	18
2.3 PROBIÓTICOS	19
2.4 TESTES ACELERADOS DE VIDA DE PRATELEIRA	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 LEITE CONCENTRADO	22
3.2 TRATAMENTO COM ULTRASSOM	22
3.2.1 Análises físico-químicas realizadas no leite concentrado a 20% após a aplicação de ultrassom	23
3.3 ADIÇÃO DOS PROBIÓTICOS	25
3.4 OBTENÇÃO DO LEITE EM PÓ	26
3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS NO LEITE EM PÓ E NO LEITE RECONSTITUÍDO	27
3.5.1 Atividade de água	27
3.5.2 Umidade	27
3.5.3 Cor (L*)	27
3.5.4 Acidez	28
3.5.5 pH	28
3.5.6 Insolubilidade	28
3.5.7 Determinação do teor de gordura, proteína, caseína e lactose	29
3.5.8 Análises Microbiológicas	29
<i>3.5.8.1 Eficiência de encapsulação</i>	<i>29</i>
<i>3.5.8.2 Contagem de bactérias lácticas</i>	<i>29</i>
3.6 TESTE DE VIDA DE PRATELEIRA ACELERADA DO LEITE EM PÓ	30
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 ULTRASSOM APLICADO NO MODO DE OPERAÇÃO NORMAL E SWEEP NO LEITE INTEGRAL CONCENTRADO A 20%	33
4.1.1 Acidez	33

4.1.2 Viscosidade	36
4.1.3 pH	42
4.1.4 Insolubilidade	45
4.2. ESCOLHA DAS CONDIÇÕES DE TRATAMENTO DE ULTRASSOM A SEREM EMPREGADAS NO LEITE CONCENTRADO QUE FOI POSTERIORMENTE SECADO EM <i>SPRAY DRYER</i>	53
4.3. LEITE EM PÓ E LEITE RECONSTITUÍDO	54
4.3.1 Atividade de água e umidade	54
4.3.2 Luminosidade (L*)	60
4.3.3 Acidez e pH	63
4.3.4 Insolubilidade	69
4.3.5 Composição	74
4.3.6 Eficiência de encapsulação da cultura probiótica	80
4.3.7 Bactérias lácticas	81
4.3.8 Vida de prateleira acelerada	84
5 CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

A procura cada vez maior por parte dos consumidores por estilo de vida saudável, e o fato da população brasileira alimentar-se inadequadamente em quantidade e qualidade, estudos que empreguem novas tecnologias na indústria de lácteos são bem-vindos, principalmente se agregar valor nutricional aos produtos, melhorar os padrões de qualidade, e principalmente satisfazer os anseios e as necessidades dos consumidores. Dentre essas tecnologias está o ultrassom (US), que se fundamenta na formação, crescimento e implosão de microbolhas, denominada de cavitação, sendo esse o principal mecanismo responsável pela maioria das aplicações de US na indústria de alimentos (LIU, 2012).

O US tem sido aplicado na indústria de leite com diferentes objetivos, tais como inativação de microrganismos, emulsificação e homogeneização, extração, mudança de viscosidade e textura (SORIA; VILLAMIEL, 2010). No entanto, até o presente momento não se encontram trabalhos científicos relacionados a efeitos desta tecnologia que, conseqüentemente, causariam impacto no processo de fabricação de leite em pó integral adicionado de probióticos, assim como impactos de qualidade no próprio produto obtido.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do US em leite integral concentrado, assim como em leite em pó integral reconstituído adicionado de probióticos.

1.1.1 Objetivos específicos

- Aplicar diferentes modos de operação do US em leite concentrado a 20% de sólidos em diferentes condições de amplitudes, temperaturas e tempos;
- Avaliar uma melhor condição para favorecer a secagem desse leite em *spray dryer*;
- Produzir leite em pó integral com e sem a adição de probiótico *Lactobacillus rhamnosus*;

- Mensurar parâmetros de atividade de água, umidade e L^* nos leites em pó obtidos, assim como acidez, pH, insolubilidade, composição, eficiência de encapsulação e contagem de bactérias lácticas nos leites reconstituídos.
- Realizar teste acelerado de vida de prateleira nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C durante 120 dias dos leites em pós elaborados;

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEITE E DERIVADOS LÁCTEOS

Leite e seus derivados são frequentemente incluídos como elementos importantes em uma dieta balanceada, isso porque sua composição oferece nutrientes essenciais para a nutrição humana abrangendo aproximadamente 87% de água, 4 a 5% de lactose, 3% de proteínas, 3 a 4% de gordura, 0,8% de minerais e 0,1% de vitaminas (PEREIRA, 2014).

Dentre os diferentes produtos lácteos presentes no mercado alguns se sobressaem, como: queijos, manteiga, creme de leite, requeijão, leite UHT e leite em pó.

A Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de número 369 de 04 de setembro de 1997 (BRASIL, 1997) define como leite em pó o produto obtido por desidratação do leite de vaca integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados. Além disso, essa Portaria fixa a identidade e as características mínimas de qualidade, tanto físico-químicas, sensoriais e microbiológicas, que deverá apresentar o leite em pó destinado ao consumo humano.

Uma das tecnologias mais utilizadas para fabricação de leite em pó é o chamado *spray drying* ou secagem por pulverização podendo ser definido como a transformação dos alimentos em estado fluido para a forma seca através da pulverização em um meio de secagem quente. Durante as últimas três décadas, a secagem por aspersão foi submetida a uma intensa pesquisa e desenvolvimento, de modo que o equipamento moderno pode cumprir os requisitos para produzir um pó com as especificações feitas sob medida exigidas pelo utilizador final (WESTERGAARD, 2004).

A capacidade de reidratação dos produtos lácteos em pó diminui durante seu armazenamento (FYFE et al., 2011). Essa diminuição está relacionada com alto teor de caseína micelar, uma vez que essas micelas tendem a se agregar perto da superfície da partícula de pó, sendo liberadas em solução mais lentamente do que proteínas de soro, o que ocorre devido à caseína micelar formar uma estrutura

porosa, tipo gel que restringe a dispersão das micelas individuais na fase líquida circulante sem impedir a penetração de água e solubilização de componentes não micelar. Durante o armazenamento ocorre aumento das interações entre e dentro das micelas, levando a agregação de micelas de caseína embaladas em conjunto, o que dificulta a solubilização dos pós (MIMOUNI et al., 2010).

Três tipos de reações são deteriorantes e determinam a vida de prateleira do leite em pó na prática: cristalização da lactose, oxidação lipídica e reações de *Maillard* (THOMSEN et al., 2005).

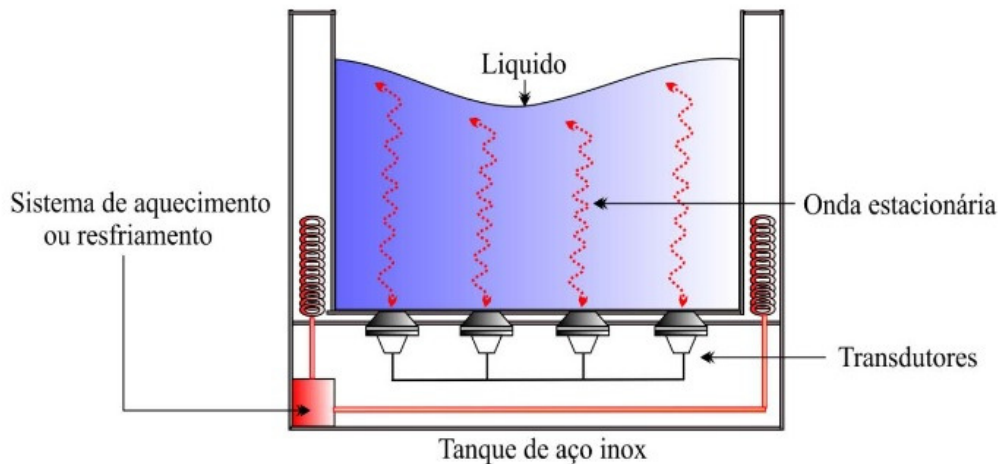
2.2 ULTRASSOM (US)

O uso do US expandiu-se na indústria de alimentos, medicina, eletrônica, oceanografia, militar, robótica, entre outras. Portanto, em muitos campos, torna-se uma forte ferramenta utilizada em técnicas sensíveis, não destrutivas e não invasivas. A onda de US é uma onda mecânica com frequências superiores a 16 kHz de propagação de partículas, de média vibração que se desloca através da massa do material, dependendo de suas propriedades físicas e mecânicas, tais como a textura e sua estrutura (SORIA; VILLAMIEL, 2010).

Os equipamentos de US podem ser de banho ou sonda (MASON; PANIWNKY; LORIMER, 1996).

A energia do US, no banho ultrassônico (Figura 1), é cedida diretamente ao líquido que preenche o recipiente, geralmente água, que transfere essa energia ao alimento imerso nesse líquido (ALVES et al., 2013). Os transdutores são responsáveis por essa passagem de energia, os quais vão conectados a um equipamento eletrônico capaz de fornecer energia elétrica nas condições necessárias (frequência e intensidade) para excitá-los, sendo que todos devem vibrar na mesma fase aumentando a quantidade de energia acústica produzida na superfície (MASON, 2011).

Figura 1 - Secção de um banho ultrassônico.



Fonte: (POVEY; MASON 1998 apud CARVALHO, 2014).

Alguns banhos ultrassônicos possibilitam operar em diferentes modos de operação, incluindo modo normal e *sweep*. No modo normal o banho opera estabilizado em uma frequência fixa, o que proporciona um fluxo de líquido otimizado no tanque. No modo *sweep* o gerador oscila a frequência ultrassônica em uma faixa estreita. Assim o efeito de cavitação é distribuído de forma mais homogênea, eliminando zonas de baixa performance próximas aos cantos do tanque (ANALÍTICA, 2015).

O US é capaz de produzir efeitos nos alimentos através dos efeitos físicos, mecânicos e químicos da cavitação acústica. Processo que envolve a formação, o crescimento e o violento colapso de pequenas bolhas no líquido como resultado da flutuação da pressão acústica (JAMBRAK et al., 2010). O processo de formação, crescimento e implosão das microbolhas é chamado cavitação, que é o principal mecanismo responsável pela maioria aplicações de US na indústria de alimentos (LIU, 2012).

O US foi aplicado na indústria de leite visando a inativação de microrganismos, homogeneização, desnate, dissolução, decréscimo de viscosidade, fermentação, filtração. Nas aplicações do US são levados em consideração os fatores como frequência, potência e tempo de estimulação, propriedades físicas, químicas e propriedades funcionais do alimento (PINGRET; TIXIER; CHEMAT, 2013).

A ultrassonografia analítica envolve o monitoramento e controle de qualidade de produtos lácteos com base em variações físico-químicas durante o armazenamento ou processamento. O US de alta intensidade tem sido empregado para aplicações de processamento como pasteurização, homogeneização, fermentação e extração (MOHAMMADI et al., 2014).

O US promove homogeneização, redução do tamanho dos glóbulos gordurosos e inativação microbiana ao mesmo tempo. Assim o emprego do US de fluxo contínuo poderia ser uma técnica promissora para o processamento do leite (CAMERON; McMASTER; BRITZ, 2009).

2.2.1 Viscosidade

Os fatores que mais influenciam na viscosidade das soluções proteicas estão relacionados com as interações entre as moléculas, assim como o tamanho das partículas de proteínas.

A distribuição e o tamanho das partículas de proteínas têm sua importância sobre o fluxo. O comportamento do fluxo de dispersões de proteínas está relacionado com suas composições, forma molecular, e com o tamanho e a carga das proteínas. Por outro lado, o comportamento do fluxo tende a ser Newtoniano (isto é apresenta viscosidade constante) em suspensões de proteínas após a aplicação de US de alta intensidade (GABRIELE et al., 2009).

O US de baixa frequência e alta potência (20 kHz) tem potencial aplicação industrial na redução da viscosidade do leite concentrado em preparação para a secagem por pulverização. A viscosidade de leite concentrado desnatado contendo 50 a 60% de sólidos diminuiu tanto em um processo usando banho ultrassônico ou em linha (sonda) durante a evaporação, sendo que o efeito foi maior em soluções de alta viscosidade pelo aumento no conteúdo de sólidos (ZISU; SCHLEYER; CHANDRAPALA, 2013).

2.2.2 Glóbulos de gordura

A eficiência do processo de homogeneização pelo US foi examinada por meio do tamanho dos glóbulos de gordura em microscópio. Essas observações

foram suficientes para demonstrar que o US produziu soluções uniformes com dispersão de glóbulos de gordura de tamanho reduzido em comparação aos homogeneizados pelo método convencional. O efeito de homogeneização do leite adequado do US vai ocorrer com as combinações específicas de potência e tempo de exposição. Assim, tempos de exposição mais longos produzem menores glóbulos de gordura, com tamanhos semelhantes aos repetidos com um homogeneizador convencional, embora fosse esperado, que uma exposição mais longa proporcionasse um melhor efeito (WU; HULBERT; MOUNT, 2001).

2.2.3 Solubilidade das proteínas

O US melhorou a solubilidade inicial das proteínas concentradas de leite em pó em comparação com as proteínas não tratadas. Ocorreu aumento na diferença de solubilidade entre as proteínas tratadas (20 kHz a 50% de amplitude durante 1 minuto) e não tratadas com US com o tempo de armazenamento, de modo que em 60 dias, as proteínas tratadas com US, apresentaram efeito positivo substancialmente, mesmo ocorrendo alguma perda de solubilidade global com o tempo (CHANDRAPALA et al., 2014).

O cisalhamento de qualquer tipo, incluindo homogeneização, microfluidização ou pelo ultrassom nas proteínas concentradas do soro antes da secagem por pulverização pode aumentar a solubilidade do leite em pó após armazenamento (AUGUSTIN et al., 2012).

YanJun et al., (2014) relataram que a potência do US pode melhorar as propriedades funcionais da concentração de proteína do leite, como solubilidade, emulsificação e gelificação. Em outra investigação, foi demonstrado que o US pode aumentar a velocidade de hidrólise da lactose e transgalactosilação de bifidobactérias no leite levando aos produtos com menor lactose e oligossacarídeos superiores com reduzido sabor indesejável (NGUYEN; LEE; ZHOU, 2012).

2.2.4 Açúcares

Devido ao curto tempo de secagem dentro da câmara, a maioria dos pós contendo açúcar que são produzidos por *spray drying* tem tempo insuficiente para fazer um arranjo termodinamicamente estável em duas ou três dimensões (forma cristalina), sendo assim, um pó amorfo é tipicamente formado, os quais têm uma tendência a absorver umidade do ambiente causando a formação de pontes entre partículas e fazer pós aglomerados. Os pós pegajosos e pós endurecidos não são de fluxo livre e causam problemas significativos no manuseio e armazenamento (AGUILERA et al., 1995), sendo que esse problema pode ser reduzido pela cristalização parcial ou completa dos componentes amorfos após o processamento.

Recentemente tem surgido interesse dos efeitos do US na cristalização da lactose como uma técnica inovadora para melhorar e controlar as propriedades dos cristais melhorando a qualidade dos produtos cujo ingrediente é a lactose (ZAMANIPPOOR;MANCERA, 2014).

2.2.5 Microbiologia

O efeito do US de alta intensidade na estimulação da fermentação do leite foi testado com quatro cepas de bifidobactérias e o mesmo foi capaz de estimular atividades das mesmas no leite, fato esse comprovado através da avaliação das concentrações de lactose e galacto-oligossacarídeos. O ultrassom de alta intensidade oferece um bom potencial para a produção de leite com grande quantidade de oligossacarídeos e baixa concentração de lactose (NGUYEN; LEE; ZHOU, 2009).

O US promoveu inativação microbiana em amostras de alimentos contendo alto teor de lipídios. Podendo ser utilizado essa tecnologia como substituição dos métodos convencionais, uma vez que apresenta como vantagem a possibilidade de empregar temperaturas menores que não promovem a degradação de compostos termossensíveis (PINGRET; TIXIER; CHEMAT, 2013).

2.3 PROBIÓTICOS

A produção industrial de alimentos requer a adição de ingredientes funcionais para adequar o sabor, cor, textura ou preservação. Além disso, a inclusão de ingredientes com potenciais benefícios a saúde, tais como antioxidantes e probióticos está aumentando. Mas esses alimentos necessitam de controle da estabilidade dos compostos bioativos durante o processamento e armazenamento, com o objetivo de prevenir as reações prejudiciais no interior da matriz alimentar transportadora, e no destino dos alimentos após a introdução no corpo humano. No caso dos probióticos é obrigatório que apresente estabilidade no trato gastrointestinal para permitir uma liberação controlada quando encapsulados (BORGOGNA, et al., 2010).

No Brasil, a legislação recomenda uma ingestão diária de 10^8 - 10^9 UFC de probióticos no produto pronto para consumo, porém, valores menores podem ser aceitos, desde que a eficácia seja comprovada pela empresa (BRASIL, 2016).

Justamente por apresentarem condições favoráveis, os produtos lácteos são os alimentos mais utilizados como veículos para os probióticos (THAMER; PENNA, 2006) decorrente que alguns probióticos são sensíveis a alguns fatores ambientais como acidez, pH, oxigênio, umidade, etc.

Os principais probióticos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que fazem parte da microbiota nativa do intestino humano, devido exercerem efeitos benéficos para a saúde humana e melhorarem as propriedades da microbiota nativa (MENEZES; DURRANT, 2008; COOK et al., 2012).

Lactobacillus rhamnosus pertence ao grupo dos mesófilos, mas dependendo da estirpe as culturas podem crescer a temperaturas inferiores a 15°C ou superiores a 40°C, sendo que para crescer, necessita vitaminas e cálcio (VALÍK; MEDVEDOVÁ; LIPTÁKOVÁ, 2008). *Lactobacillus rhamnosus* GG é uma cepa que vem sendo amplamente utilizada no desenvolvimento de novos produtos com probióticos, isso porque pode sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal e consegue permanecer por alguns dias na microbiota do intestino, sem que haja uma nova suplementação oral, sendo importante na prevenção de certas doenças intestinais (GOLDIN et al., 1992).

Conforme Correia, Libredo e Consoli (2012) os principais efeitos benéficos atribuídos aos probióticos estão relacionados com o aumento da mobilidade

intestinal, o que evita o crescimento excessivo de bactérias (modulação da microbiota intestinal), com a melhoria das funções da barreira intestinal e com a modulação da resposta imune. Dentre os 24 benefícios relatados na literatura se destacam a proteção contra patógenos, redução dos níveis de colesterol e pressão arterial, atividade anticarcinogênica, melhoria na absorção de nutrientes, redução da intolerância a lactose, alívio da constipação, entre outros (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

Os métodos de microencapsulação de probióticos seguem três metodologias principais: *spray drying*, emulsificação e extrusão (COOK et al., 2012). Quando a secagem por *spray drying* é utilizada, normalmente, uma grande parte da atividade probiótica é perdida depois de algumas semanas de armazenamento à temperatura ambiente. Isso está associado ao estresse imposto pela temperatura de processamento e mudanças bruscas da fase de secagem, sendo uma combinação que confere danos às membranas celulares e proteínas do microrganismo probiótico. Um recurso importante utilizado para melhorar a viabilidade dessa cultura probiótica nesse tipo de encapsulação é a adição de termoprotetores antes da secagem (MENEZES et al., 2012). Essas substâncias adicionadas ao meio de secagem ajudam na proteção da viabilidade das células probióticas. Algumas dessas substâncias termoprotetoras incluem leite em pó desnatado, proteína de soro de leite, glicerol, lactose e polímeros (HUBALEK, 2003).

Matrizes lácteas são benéficas para encapsulamento de bactérias probióticas, e sua eficácia na proteção da viabilidade celular durante a secagem é relacionada com a presença de lactose e proteínas em suas composições. O estudo de Maciel et al. (2012) comprovou essa eficácia comparando a influência de leite desnatado e soro de leite doce, produtos lácteos com diferente conteúdos e perfil de lactose e proteína, sobre o rendimento de encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* La-5, e a resistência do probiótico na passagem através de condições gastrointestinais simuladas, e sua viabilidade durante 90 dias de armazenagem a 4°C e 25°C, sendo que ambos os materiais mostraram-se adequados nas propostas do estudo.

2.4 TESTES ACELERADOS DE VIDA DE PRATELEIRA

Informações sobre a vida de prateleira de novos produtos são fatores primordiais durante o desenvolvimento de produtos, assim como para seu lançamento no mercado.

O teste acelerado de vida de prateleira (TAVP) consiste no armazenamento de determinado produto sob condições ambientais definidas e controladas de forma a acelerar as taxas de transformação, sendo que essas condições são estabelecidas através da conversão dos dados existentes em parâmetros cinéticos. As taxas aceleradas de transformação determinadas são, então, relacionadas a aquelas obtidas sob condições normais de armazenamento. Dessa forma, em tempo reduzido de estudo, a vida de prateleira do produto é estimada (VITALI et al., 2004).

Leites em pó possuem uma vida de prateleira de aproximadamente 12 meses, quando armazenados em condições adequadas, e nesses tipos de alimentos, que apresentam vida de prateleira mais longa, os produtos são submetidos a condições de armazenamento relativamente severas, bem definidas e controladas, de forma a acelerar as taxas de transformação dos alimentos (MOURA et al., 2007).

No estudo de vida de prateleira são observadas as alterações na qualidade do produto e o tempo que o mesmo leva para se deteriorar até o limite que o torna impróprio para o consumo. A identificação dos atributos que se alteram e a definição quantitativa desses atributos são maneiras de monitorar a perda de qualidade durante o armazenamento (VITALI et al., 2004).

Levando em consideração os aspectos físico-químicos e microbiológicos que promovem a aceitação, e a qualidade dos produtos lácteos, assim como a necessidade de aplicação industrial de métodos e tecnologias que agreguem valor e qualidade aos produtos, o US pode ser uma alternativa viável na indústria de lácteos, agregando qualidade dos produtos nos quesitos físico-químicos, e/ou favorecendo a sobrevivência ou crescimento de microrganismos quando se trata de probióticos. Na literatura pouco se encontra sobre os benefícios do US em relação a qualidade de leite em pó em seus aspectos físico-químicos e microbiológicos quando o produto é adicionado de microrganismos probióticos e exposto a testes acelerados de vida de prateleira sob diferentes condições de temperatura e umidade relativa controlada, motivos esses que motivaram a realização desse trabalho, a fim de buscar agregação de valor ao produto leite em pó.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LEITE CONCENTRADO

As amostras de leite concentrado a 20% foram preparadas a partir de leite concentrado integral a 50% obtido em uma empresa fabricante de leite em pó do Rio Grande do Sul, Brasil. Esse leite foi diluído com água destilada neutralizada a temperatura de 20°C até atingir 18±0,3°Brix e posterior confirmação da concentração de sólidos de 20±0,5% pelo método gravimétrico baseado na diferença de peso conforme metodologia descrita em Brasil (2006), método C – Umidade e voláteis e sólidos totais – método C com alterações. Foram utilizadas 3 g de amostra colocadas por 30 minutos em banho-maria a 65°C e posteriormente em estufa a 102°C por 3 horas com emprego da equação (1) para o cálculo de sólidos totais.

$$\% \text{ ST} = \text{Peso após estufa} - \text{Peso cápsula} / \text{Peso amostra} \times 100 \quad (1)$$

O leite pasteurizado padronizado da indústria utilizado na concentração para 50% apresentou uma composição média de 3,34% de gordura; 8,74% de extrato seco desengordurado; 12,03% de extrato seco total; 4,63% de lactose; 3,25% de proteína e 2,38% de caseína.

O leite concentrado a 20% permaneceu durante aproximadamente 24 horas a temperatura de refrigeração (8±1 °C) até a realização dos tratamentos.

3.2 TRATAMENTO COM ULTRASSOM

O leite concentrado a 20% foi separado em 4 frações de 400 mL previamente medido em proveta de 500 mL e depois repassado para Erlenmeyer de 500mL, os quais posteriormente foram acomodados em banho ultrassônico (marca Elma® modelo TI-H-10) e submetidos a 25 kHz de frequência nos modos de operação normal e *sweep*, onde no estudo variou-se a temperatura, o tempo de exposição, e a amplitude.

Para avaliar a influência do ultrassom no leite concentrado a 20% foram avaliadas três variáveis independentes importantes no processamento do leite: temperatura do leite (5 a 40°C) através de termômetro tipo espeto marca Akso,

modelo AK02, tempo de exposição ao US (2 a 30 minutos) e amplitude do ultrassom (20 a 80%), sendo todos os tratamentos realizados em duplicata. Assim, o planejamento experimental utilizado foi fatorial completo em delineamento composto central rotacional 2^3 (8 pontos fatoriais ou vértices do cubo), com 6 pontos axiais e 6 repetições no ponto central, totalizando 20 ensaios (Tabela 1) para cada modo de operação, conforme metodologia descrita em Rodrigues e Lemma (2005). Cada tratamento foi acompanhado de uma amostra controle sem tratamento de US.

Tabela 1 - Valores utilizados no delineamento composto central rotacional (DCCR) com três variáveis.

Variáveis/Níveis		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura (°C)	X1	5	12,53	22,5	32,47	40
Tempo (min.)	X2	2	7,67	16	24,33	30
Amplitude (%)	X3	20	32,14	50	67,86	80

As variáveis resposta (dependentes) foram: acidez ($^{\circ}$ Dornic), viscosidade (cP), pH (adimensional), insolubilidade (g) e cor, mas determinando somente o L^* (adimensional). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e regressão pelo procedimento RSREG ao nível de 5% de significância.

As análises estatísticas foram executadas no aplicativo SAS[®] *System for Windows*[™] versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA).

3.2.1 Análises físico-químicas realizadas no leite concentrado a 20% após a aplicação de ultrassom

Após três horas da aplicação do ultrassom nas amostras de leite concentrado a 20% foram realizadas as análises de pH e cor. Enquanto que as análises de viscosidade, insolubilidade e acidez foram realizadas 24 horas após a aplicação do ultrassom, sendo que durante todo esse tempo as amostras permaneceram armazenadas a temperatura de 8 ± 1 °C.

3.2.1.1 Acidez

A avaliação da acidez das amostras de leite concentrado foi realizada a temperatura de 8 ± 1 °C, conforme metodologia descrita em Brasil (2006), método B - acidez titulável em leite fluido, com resultados em °Dornic.

3.2.1.2 Viscosidade

Para a avaliação de viscosidade das amostras de leite concentrado foi utilizado o viscosímetro *Brookfield* modelo DV-I Prime, utilizando *spindler 62* com velocidade de 100 rpm e as amostras analisadas estavam a 20 ± 1 °C.

3.2.1.3 pH

A análise de pH foi realizada em pHmetro de duplo canal da marca Digimed, modelo DM-23-DC com a amostra a 25 °C em eletrodo modelo DME-CV1.

3.2.1.4 Insolubilidade

Para análise de insolubilidade utilizou-se a técnica descrita por Westergaard (2004) com adaptações. Primeiramente pesaram-se os tubos plásticos da centrífuga graduados de 50 mL e registrava-se o peso para posteriormente adicionar 50 gramas com variação de $\pm 0,005$ gramas de leite nos mesmos (marcação de 50 mL aproximadamente). Após esses procedimentos o leite foi centrifugado em centrífuga (marca Excelsa® II, modelo 206-BL), por 5 minutos a velocidade de 1300 rpm. Após a centrifugação retirou-se o leite até a marcação de 15 mL e completava-se o volume até a marcação de 50 mL com água destilada a temperatura de 20 °C e novamente se realizava a centrifugação nos mesmos parâmetros anteriores. Após o procedimento os frascos centrifugados foram virados até o total escoamento do leite por 5 minutos, secava-se a parte interna do tubo com pano absorvente e procedia-se a pesagem do material que ficava no fundo do tubo (insolúveis) com emprego da equação (2) para o cálculo de insolúveis.

$$\text{Insolubilidade} = \text{Peso tubo após centrifugação} - \text{Peso tubo vazio} \quad (2)$$

3.2.1.5 Cor

A avaliação de cor das amostras foi realizada em colorímetro Minolta (marca KONICA MINOLTA® modelo CM-700d). Foi utilizado iluminante D65 e componente especular incluso (SCI). Foi utilizada cubeta de vidro preenchida com 6mL de amostra a temperatura de 25°C. Foram realizadas 6 replicações em cada amostra (3 pontos diferentes em cada lado da cubeta). O equipamento foi colocado horizontalmente na bancada e a cubeta ficava em linha reta junto à parte de medição de amostrado equipamento. Para cada leitura a cubeta era deslocada de forma a abranger 3 leituras de cada lado da cubeta em pontos distintos. O parâmetro mensurado foi L*, indicador de luminosidade.

3.3 ADIÇÃO DOS PROBIÓTICOS

A cultura probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* (Sacco, Lyofast LR B, São Paulo, Brasil) foi dosada nas amostras de leite concentrado tratado com US e em amostra não tratada com US. Para escolher a amostra tratada levou-se em consideração principalmente viscosidade e acidez (Tabela 1). Para cálculo da quantidade a ser adicionada de probiótico, levou-se em consideração a indicação do fornecedor da cultura.

A cultura de probiótico foi adicionada diretamente no leite concentrado a 20% em uma proporção de 0,0341 g para cada 1000 mL de leite a temperatura de 12°C, o qual ficou sob agitação, em agitador magnético (marca Fisatom, Modelo 752^a), a uma velocidade de 8 rpm durante 15 minutos e posteriormente foi levado para o *spray dryer*, ficando sob constante agitação durante todo o processo de forma a manter a homogeneização de sólidos. O tempo de secagem de cada 1000 mL de leite foi de 1 hora e 25 minutos (vazão de 0,8 litros/hora) sendo que o leite foi mantido a 12°C com utilização de banho de gelo quando necessário.

3.4 OBTENÇÃO DO LEITE EM PÓ

Para obtenção do leite em pó a partir do leite concentrado a 20%, foi utilizado o *spray dryer* LM MSD 1.0 (marca Labmaq) com capacidade máxima de secagem de 1 litro/hora.

A vazão de alimentação do leite empregada no *spray* foi de 0,8 litros/hora com temperatura interna do ar de 106 °C, sendo que a temperatura do ar de saída variou de 55 a 61 °C. A vazão de ar na câmara foi de 40 litros/minuto. A temperatura de trabalho interna do ar de secagem no *spray* foi selecionada através de testes preliminares onde foram acompanhados os resultados de umidade no leite em pó obtido, de forma a atender a legislação que estipula umidade máxima de 3,5% (BRASIL, 1996).

Foram realizados três diferentes tipos de tratamentos: leite sem probióticos e sem US (AB); leite com probióticos e com US (LUS) e leite com probióticos e sem US (SUS). Esses foram obtidos em dois momentos diferentes (Experimento 1 e 2). Cada um desses experimentos gerou 975 g de leite em pó. Foram utilizados no total 33 litros de leite concentrado a 20%, e foram obtidos 5.850 gramas de leite em pó, sendo necessárias 48 horas de secagem, ou seja, 6 dias de secagem trabalhando 8 horas por dia. O *spray dryer* foi abastecido com amostras consecutivas de 1 litro de leite, sendo que a cada 2 litros processados, procederam-se intervalos para descanso do aparelho, e nesse período, recolheu-se o leite em pó que estava nos frascos coletores na saída do *spray* e na saída do ciclone. Entre a secagem de diferentes tratamentos, o leite em pó aderido nas paredes do equipamento e nos frascos coletores era removido, e o equipamento higienizado por completo com água quente, detergente neutro e álcool 70%, com o objetivo de evitar contaminação cruzada entre um tratamento e outro.

Todo leite em pó obtido foi embalado a vácuo em quantidades de 75 gramas por pacote (17,4 cm de altura x 16,4 cm de largura), cujas embalagens apresentaram 75 micras de espessura por parede compostas de: uma camada de polietileno de baixa densidade, uma camada de adesivo e uma camada de poliéster metalizado (camada externa) com TPVA (taxa de permeabilidade ao vapor d'água) de 0,87 gramas/m²/dia a 38 °C em 90% de umidade relativa e TPO₂ (taxa de permeabilidade ao oxigênio) de 2,36 cm³/m²/dia a 23 °C e 0% de umidade relativa. Todas as embalagens do experimento 1 permaneceram a 20 °C durante 12 dias dentro de uma

embalagem de *nylon* e polietileno composta de 5 camadas (*nylon*, adesivo, *nylon*, adesivo, polietileno) com $TPO_2 < 30 \text{ cm}^3/\text{m}^2/\text{dia}$, enquanto que as amostras do experimento 2 permaneceram por 6 dias dentro dessa embalagem a mesma temperatura.

3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS NO LEITE EM PÓ E NO LEITE RECONSTITUÍDO

Foram realizadas as análises físico-químicas de atividade de água, umidade e cor (L^*) para o leite em pó. Acidez, pH, insolubilidade, gordura, proteína, caseína e lactose, assim como eficiência de encapsulação e contagem de células viáveis foram realizadas no o leite reconstituído, cujas técnicas estão descritas a seguir. Acerca das amostras de leite em pó reconstituídas, foram preparadas em água destilada neutralizada a 40°C, sendo que para obtenção de 100 mL de leite reconstituído adicionou-se 11,5 g de leite em pó em 88,5 mL de água.

3.5.1 Atividade de água

A atividade de água do leite em pó foi realizada em equipamento Aqualab® series 4TE em duplicata. O equipamento foi previamente calibrado com solução padrão de cloreto de lítio com a_w 0,25 e 0,50. A temperatura de análise foi ajustada para 25°C. Foram utilizados aproximadamente 2 g de amostra, colocadas em cápsulas para leitura.

3.5.2 Umidade

O teor de umidade do leite em pó foi determinado em duplicata em analisador de umidade (modelo MB 35, marca Ohaus) utilizando 5 g de amostra.

3.5.3 Cor (L^*)

A avaliação de cor das amostras de leite em pó foi realizada em colorímetro Minolta (marca KONICA MINOLTA® modelo CM-700d). Foi utilizado iluminante D65,

componente especular incluso (SCI) com utilização de placa de Petri com o fundo preenchido de amostra. O parâmetro mensurado foi L^* , indicador de luminosidade. Foram realizadas 6 replicações em cada amostra.

3.5.4 Acidez

A avaliação da acidez do leite reconstituído foi realizada conforme metodologia descrita em Brasil (2006), método B - acidez titulável em leite fluido, com resultados em graus Dornic ($^{\circ}$ Dornic).

3.5.5 pH

A análise de pH do leite reconstituído foi realizada em pHmetro de duplo canal (marca Digimed, modelo DM-23-DC) com a amostra a 25°C em eletrodo modelo DME-CV1.

3.5.6 Insolubilidade

Para análise de insolubilidade utilizou-se a mesma técnica descrita no item 3.2.1.4, técnica essa descrita por Westergaard (2004) com adaptações. Primeiramente pesaram-se os tubos plásticos de centrífuga graduados de 50 mL e registrava-se o peso para posteriormente adicionar 50 gramas com variação de $\pm 0,005$ gramas de leite nos mesmos (marcação de 50 mL aproximadamente). Após esses procedimentos o leite foi centrifugado em centrífuga (marca Excelsa® II, modelo 206-BL), por 5 minutos a velocidade de 1300 rpm. Após a centrifugação retirou-se o leite até a marcação de 15 mL e completou-se o volume até a marcação de 50 mL com água destilada a temperatura de 20°C e novamente se realizou a centrifugação nos mesmos parâmetros anteriores. Após o procedimento os frascos centrifugados foram virados até o total escoamento do leite por 5 minutos, secou-se a parte interna do tubo com pano absorvente e procedeu-se a pesagem do material que ficou no fundo do tubo (insolúveis) com emprego da equação (2) para o cálculo de insolúveis descrita no item 3.2.1.4.

3.5.7 Determinação do teor de gordura, proteína, caseína e lactose

Os teores de gordura, proteínas, caseína e lactose no leite reconstituído foram realizados no analisador *Milkoscan* (modelo FT1, marca FOSS) conforme manual do equipamento.

3.5.8 Análises Microbiológicas

3.5.8.1 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE%) que representa a taxa de sobrevivência de microrganismos durante o processo de secagem foi calculada de acordo com a equação (3) tal como proposto por Martin et al. (2013).

$$\text{Eq. 1. } EE = (N / N_0) \times 100 \quad (3)$$

Onde N é o número de células viáveis ($\log \text{ UFC mL}^{-1}$) libertadas a partir das microesferas no leite reconstituído, e N_0 é o número de células viáveis ($\log \text{ UFC mL}^{-1}$) no leite concentrado adicionado de probióticos antes da secagem em *spray dryer*.

Para N_0 transferiu-se 1,0 mL de leite concentrado adicionado de probióticos em 9mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}) realizando-se posteriormente as diluições decimais. Para a contagem de microrganismos probióticos foram transferidas alíquotas de 1,0 mL das diluições em triplicata para as placas de Petri, sendo um total de 5 diluições. Sobre cada amostra foi adicionado o meio de cultura MRS Agar com sobre camada. A incubação foi realizada a 37°C, por 72 horas em anaerobiose.

3.5.8.2 Contagem de bactérias lácticas

A contagem de colônias das bactérias lácticas foi realizada de acordo com o método de Sheu e Marshall (1993) com modificações e foi avaliada no tempo 1, 30, 60, 90 e 120 dias nas amostras de leite em pó para cada tratamento e para cada temperatura de armazenamento utilizada, totalizando 18 amostras em cada período.

O leite em pó foi reconstituído com água destilada neutralizada esterilizada a uma temperatura de 40°C sob agitação por 15 minutos. Transferiu-se 1,0mL de amostra desse leite reconstituído em saco estéril contendo 9,0 mL de solução tampão fosfato estéril pH 7,5 e foi realizada homogeneização (diluição 10^{-1}). Após foram realizadas as diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1%.

Para a contagem de bactérias lácticas foram transferidas alíquotas de 1,0 mL das diluições em triplicata para as placas de Petri. Sobre cada amostra foi adicionado o meio de cultura MRS Agar com sobre camada de ágar bacteriológico (Ágar Ágar) Acumedia. A incubação foi realizada a 37°C, por 72 horas em anaerobiose.

3.6 TESTE DE VIDA DE PRATELEIRA ACELERADA DO LEITE EM PÓ

Para avaliar o tempo de vida útil dos leites em pó, empregou-se o teste acelerado de vida de prateleira. Assim, 75 gramas de amostras de leite em pó foram colocadas em embalagens (17,4 cm de altura x 16,4 cm de largura) com 75 micras de espessura por parede, compostas de: uma camada de polietileno de baixa densidade, uma camada de adesivo e uma camada de poliéster metalizado (camada externa) com TPVA (taxa de permeabilidade ao vapor d'água) de 0,87 gramas/m²/dia a 38°C em 90% de umidade relativa e TPO₂ (taxa de permeabilidade ao oxigênio) de 2,36 cm³/m²/dia a 23°C e 0% de umidade relativa. As embalagens foram armazenadas em 25°C, 35°C e 45°C, em UR% de 76% durante 120 dias. As temperaturas foram escolhidas tendo em vista as diferentes regiões consumidoras de leite em pó do país.

Dessa maneira as embalagens contendo as diferentes amostras de leite em pó foram acomodadas em caixas plásticas bem vedadas, e no seu interior foi colocado uma solução de NaCl a 35% que proporcionou UR% de 76. Em cada dia de análise, após a retirada de uma embalagem de cada tipo de leite em pó de dentro das caixas plásticas, foi conferido o volume de solução de NaCl a 35%, o qual foi completado quando necessário. Os diferentes tipos de leites em pó foram analisados no tempo 1 (após fabricação), 30, 60, 90 e 120 dias de estocagem. A análise de umidade foi realizada em duplicata levando em consideração o limite de legislação de 3,5% (BRASIL, 1996).

Para a estimativa da vida de prateleira foram determinadas a ordem das reações de deterioração, a constante de velocidade da reação (k), e a energia de ativação.

Encontrada a ordem da reação, a inclinação da reta obtida, indica o valor da constante da velocidade da reação (k) para cada nível de temperatura. O efeito da temperatura na constante da velocidade das reações foi descrito empregando o modelo de Arrhenius. A energia de ativação (E) da reação foi calculada empregando a equação:

$$\ln k = \frac{-E}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) + \ln k_0 \quad (4)$$

E= energia de ativação (cal/mol);

T= temperatura absoluta final;

T0= temperatura absoluta referência;

k= constante de velocidade da reação.

A estimativa de vida de prateleira foi calculada através da equação ($y = a + bx$), gerada pelos ajustes, na regressão para todas as temperaturas utilizadas (25, 35 e 45°C).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi realizado duas vezes em dias diferentes. A análise de variância (ANOVA) utilizando o procedimento do modelo linear geral foi realizada para analisar os dados dos aspectos físico-químicos e microbiológicos, que consideraram os tratamentos como um efeito fixo e as repetições dos experimentos como um termo aleatório (n=2). Nas tabelas foi utilizado o erro padrão da média (EPM) entre o mesmo tratamento, na mesma temperatura de armazenagem nos dias de armazenagem, assim como entre os tratamentos, nas diferentes temperaturas de armazenagem no dia de armazenagem. E quando foram encontrados efeitos significativos entre tratamentos e/ou ao longo do período de armazenagem ou temperatura de armazenagem, foi empregado o teste de Tukey em nível de

significância (Sig.) $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ e $P \leq 0,001$ utilizando o programa IBM SPSS *Statistics* (SPSS, versão 21, 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ULTRASSOM APLICADO NO MODO DE OPERAÇÃO NORMAL E SWEEP NO LEITE INTEGRAL CONCENTRADO A 20%

4.1.1 Acidez

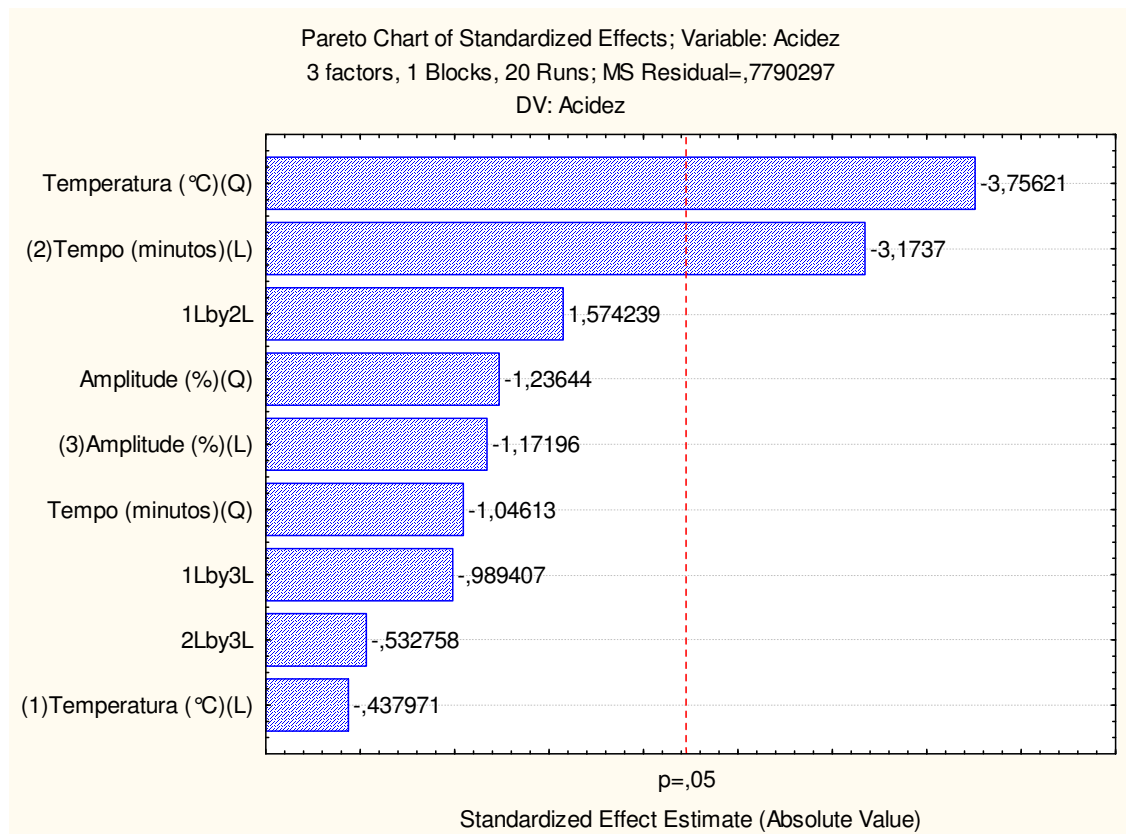
Os valores de acidez obtidos nas diferentes amostras tratadas nos diferentes modos de operação do ultrassom a 25 kHz podem ser visualizados na tabela 2.

Tabela 2 - Valores de acidez (°Dornic) nos diferentes tratamentos em que foi submetido o leite concentrado a 20% nos modos de operação normal e *sweep* no US a 25 kHz.

Número de ensaios	Fatores (Valores reais)			Variável Resposta	
	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Amplitude (%)	MODO NORMAL	MODO SWEEP
				Acidez (°Dornic)	
1	12,53	7,67	32,14	25,25	25,93
2	32,47	7,67	32,14	24,40	25,98
3	12,53	24,33	32,14	23,20	24,40
4	32,47	24,33	32,14	23,68	24,03
5	12,53	7,67	67,86	25,05	24,50
6	32,47	7,67	67,86	22,33	23,90
7	12,53	24,33	67,86	21,70	25,93
8	32,47	24,33	67,86	21,58	24,90
9	5	16	50	21,98	23,40
10	40	16	50	22,98	23,53
11	22,5	2	50	25,35	23,68
12	22,5	30	50	23,28	24,90
13	22,5	16	20	23,58	26,60
14	22,5	16	80	24,80	23,40
15	22,5	16	50	24,10	26,35
16	22,5	16	50	25,03	23,53
17	22,5	16	50	24,20	23,68
18	22,5	16	50	25,15	22,78
19	22,5	16	50	25,18	23,83
20	22,5	16	50	25,43	24,00

A temperatura de aplicação do US no modo normal, apresentou efeito significativo na forma quadrática (Q) sobre a acidez, assim como o tempo de aplicação do US apresentou na forma linear (L) (Figura 2).

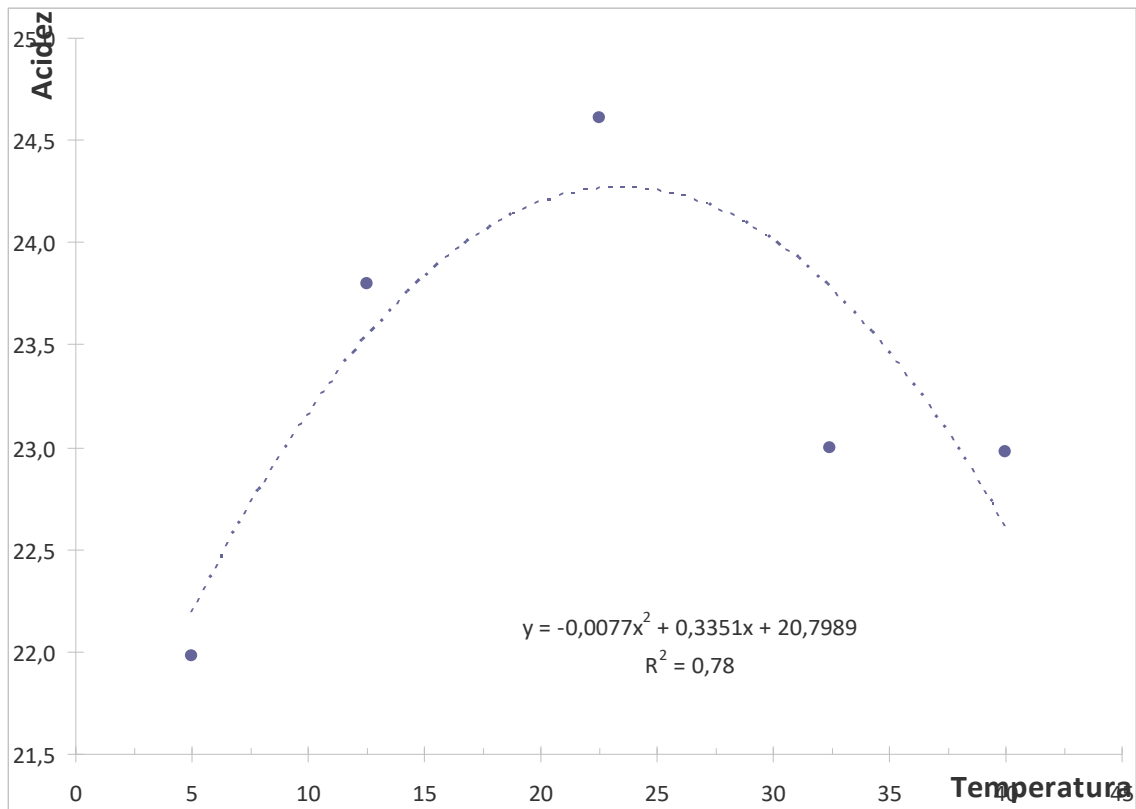
Figura 2 - Gráfico de Pareto para a variável acidez no modo de operação normal do US.



Decorrente da influência significativa da acidez no processo de secagem do leite no *spray dryer* aprofundou-se o estudo estatístico realizando ANOVA e análise do coeficiente. Ambas as variáveis que foram significativas no gráfico de Pareto (Figura 2) foram amparadas pela ANOVA, mas quando analisado o coeficiente, somente a temperatura apresentou o coeficiente amparado. Assim utilizou-se somente a influência da temperatura na acidez. Empregou-se a equação (5) e a Figura 3 para definir qual a melhor condição de temperatura a ser empregada no leite no tratamento com US, sem que venha a promover grandes alterações no leite a ser submetido ao *spray dryer*.

$$Y_{\text{acidez}} = -0,0077x^2 + 0,3351x + 20,7989 \quad (r^2 = 0,78) \quad (5)$$

Figura 3 - Variação da acidez em relação à temperatura empregada durante o tratamento do US no modo normal de operação do ultrassom, fundamentada na equação quadrática.

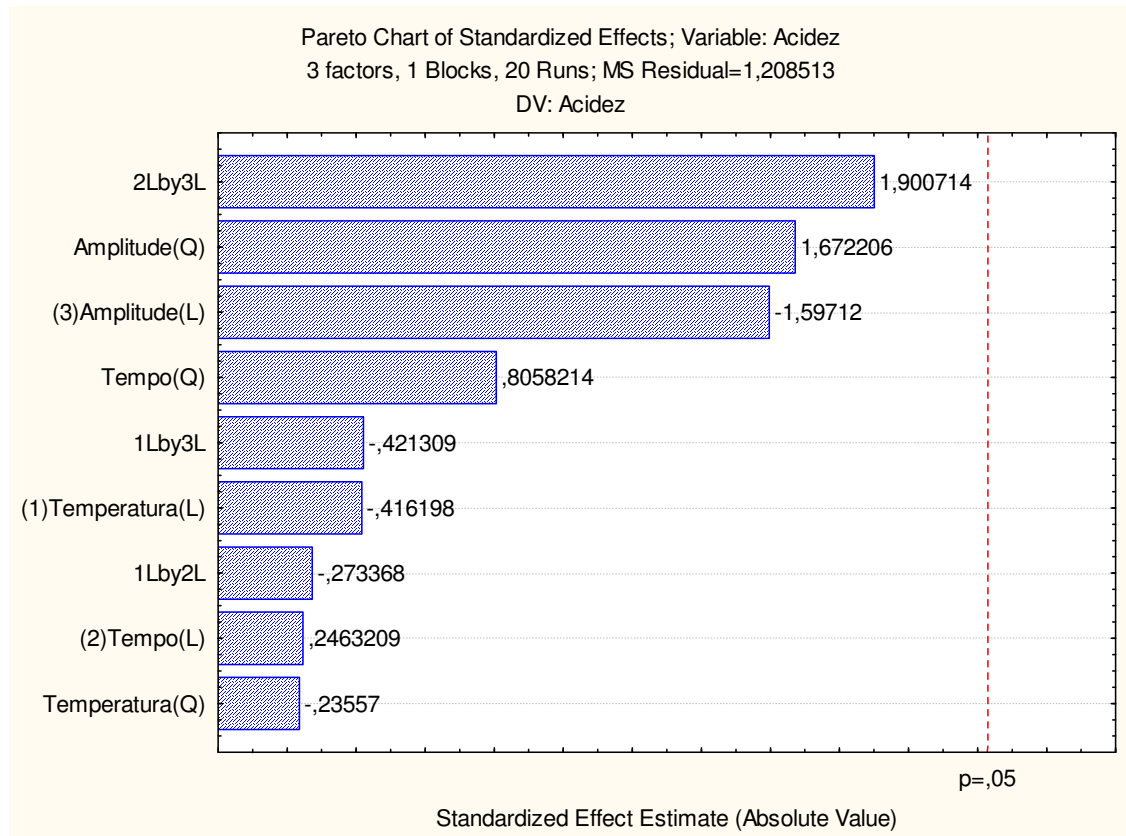


A acidez é considerada um dos parâmetros mais importantes como indicativo de qualidade de leite, isso porque está diretamente ligada a qualidade microbiológica, e com os parâmetros sensoriais e de solubilidade.

A acidez aumenta em temperaturas acima de 10°C, atingindo um ápice perto de 22,5°C, quando o leite é submetido ao tratamento com US. Em temperaturas superiores a essa ocorre diminuição da acidez (Figura 3). A acidez está ligada diretamente com o pH (item 4.1.3), uma vez que em teores de acidez elevados ocorre diminuição nos valores de pH, isso promove efeitos negativos na estabilidade térmica e na solubilidade do leite fluido (OLIVEIRA et al., 2000), o que resultaria igualmente, em um leite concentrado e em pó de baixa qualidade devido problemas de estabilidade e solubilidade.

No modo de operação *sweep* do banho de ultrassom nenhuma das variáveis independentes (temperatura, tempo e amplitude) apresentaram influência significativa nos valores de acidez (Figura4).

Figura 4 - Gráfico de Pareto para a variável acidez no modo de operação *sweep*.



Decorrente que no modo de operação *sweep* não ter ocorrido efeito significativo das variáveis independentes sobre a acidez, e no modo de operação normal ter ocorrido, e na maioria desses ensaios (12 ensaios, tabela 2) os valores de acidez serem menores do que os valores do modo *sweep*. Dessa forma escolheu-se o modo de operação normal para se tratar o leite concentrado que será posteriormente levado ao *spray dryer* para elaboração de leite em pó.

4.1.2 Viscosidade

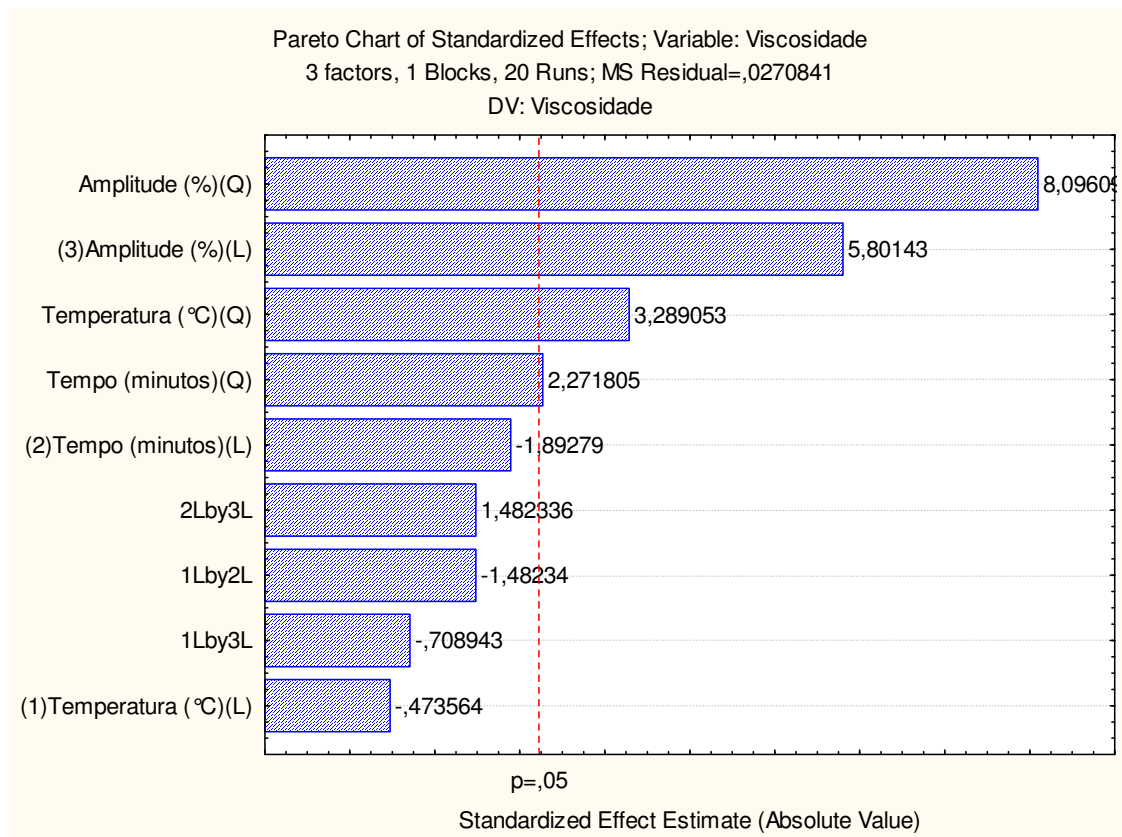
Os valores de viscosidade obtidos nas amostras tratadas nos diferentes modos de operação podem ser visualizados na tabela 3.

Tabela 3 - Valores de viscosidade (cP) nos diferentes tratamentos em que foi submetido o leite concentrado a 20% nos modos de operação normal e *sweep* do ultrassom a 25 kHz.

Número de ensaios	Fatores (Valores reais)			Variável Resposta	
	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Amplitude (%)	MODO NORMAL	MODO SWEEP
				Viscosidade média (cP)	
1	12,53	7,67	32,14	8,19	7,74
2	32,47	7,67	32,14	8,46	8,70
3	12,53	24,33	32,14	7,95	7,95
4	32,47	24,33	32,14	7,83	8,19
5	12,53	7,67	67,86	8,58	7,86
6	32,47	7,67	67,86	8,64	7,80
7	12,53	24,33	67,86	8,64	8,10
8	32,47	24,33	67,86	8,40	7,83
9	5	16	50	8,16	7,62
10	40	16	50	8,01	7,62
11	22,5	2	50	7,98	7,59
12	22,5	30	50	7,92	7,71
13	22,5	16	20	8,16	8,34
14	22,5	16	80	9,17	7,65
15	22,5	16	50	7,80	7,98
16	22,5	16	50	7,53	7,74
17	22,5	16	50	7,98	7,59
18	22,5	16	50	7,86	8,19
19	22,5	16	50	7,65	7,98
20	22,5	16	50	7,50	7,95

Pelo gráfico de Pareto (Figura 5) a amplitude apresentou efeito significativo na forma quadrática (Q) e linear (L) sobre a viscosidade no modo de operação normal, enquanto que a temperatura e o tempo apresentaram efeito significativo de forma quadrática.

Figura 5 - Gráfico de Pareto para a variável viscosidade no modo de operação normal do ultrassom.



Tratamentos com US de alta intensidade a 20 kHz com 31 W durante 1, 5, 10, 20, 30 ou 60 minutos foram realizados com objetivo de investigar possíveis alterações no tamanho das micelas de caseína em caseína micelar em pó (MC) reconstituída, pó de caseína reconstituída (NCN), pó de alta proteína com uma relação de caseína/proteínas do soro de 1:1 em massa (CNWP) e leite desnatado pasteurizado a 10°C. Ocorreu diminuição da turbidez com 60 minutos de tratamento, permanecendo inalterado o tamanho das micelas de caseína. A viscosidade do leite pasteurizado desnatado tratado com US diminuiu ligeiramente sobre o primeiro minuto de tratamento permanecendo estável durante 60 minutos de tratamento. Na amostra de caseína micelar em pó reconstituída houve diminuição de turbidez nos primeiros 10 minutos de tratamento, mantendo-se constante, o que pode ser explicado por uma separação de agregados de micelas remanescentes da diluição do pó ou uma separação nos agregados de proteína do soro ou proteína do soro com caseína ou simplesmente uma diminuição do tamanho dos glóbulos de gordura. Para o pó de caseína reconstituída a viscosidade diminuiu em função do tempo de

tratamento, o que pode ser justificado pela quebra de agregados de proteína não micelar pelo ultrassom (CHANDRAPALA et al., 2012). No leite concentrado a 20% de sólidos o aumento da viscosidade se deu conforme aumentou a amplitude e o tempo de exposição ao US no modo normal de operação, condições essas que poderiam ter favorecido a formação de agregados de proteínas. A cavitação acústica do US seria a causa da formação desses agregados, decorrente da força de cisalhamento gerada, a qual deve ter promovido a quebra de algumas cadeias de proteínas (caseínas livres e proteínas do soro) conforme citado acima por Chandrapala et al., 2012, permitindo dessa maneira a formação desses agrupamentos maiores de proteínas, e reagregação das mesmas nas micelas de caseína, aumentando, conseqüentemente a viscosidade.

A viscosidade do leite concentrado a 20% influencia na qualidade do leite em pó obtido, uma vez que quanto menor for o valor da viscosidade, mais benefícios trará ao processo de *spray dryer* e ao produto. A viscosidade influencia principalmente sobre o tamanho das gotículas que serão atomizadas. Viscosidade alta promoverá gotículas grandes, enquanto que viscosidade baixa promoverá gotículas menores, que mais rapidamente secarão, decorrente que a água começa a evaporar-se nas superfícies das gotas no mesmo momento que entra em contato com o ar quente e seco do spray (BARTHOLOMAI, 1991), e isso promoverá a obtenção de valores baixos de umidade e atividade de água no leite em pó obtido. Assim, nesse estudo verificou que em amplitudes acima de 50 ocorre aumento na viscosidade (Figura 5), enquanto que em amplitudes entre 20 e 50 os valores de viscosidades foram menores. Dessa maneira poderiam ser empregadas amplitudes na faixa de 20 a 50 para termos efeitos benéficos nos valores de viscosidade no leite que será submetido ao *spray dryer*.

Qualquer esforço que se faça com o objetivo de melhorar a atomização do leite para criar uma nuvem de atomização mais fina, resultará em uma temperatura de saída do leite mais baixa, decorrente que a relação superfície específica/massa das partículas se torna maior. A evaporação será, portanto, mais fácil e requer uma força motriz menor (Δt diferença de temperatura entre a partícula e o ar). Em estudo realizado por Zisu et al. (2013) leite concentrado desnatado a 50% foi tratado em banho de US entre as potências de 40 a 80 W durante 1 minuto a 50°C e avaliado a viscosidade 30 minutos depois de efetuado o tratamento. Observaram que a viscosidade diminuiu em torno de 10% em relação ao leite não tratado. Observaram

também no leite concentrado, que com o tempo ocorre aumento na viscosidade, e que o emprego do US poderia auxiliar na redução dessa viscosidade, facilitando a pulverização desse leite no *spray dryer*.

As análises de viscosidade foram realizadas 24 horas após o tratamento de US, e os maiores valores de viscosidade ocorreram em amplitudes altas (acima de 50, Tabela 3), demonstrando o efeito do US nas proteínas do leite, principalmente nas proteínas do soro, demonstrando dessa maneira a importância de se avaliara viscosidade no leite que vai ser submetido ao processo de *spray dryer*. Decorrente desses acontecimentos aprofundou-se o estudo estatístico, das variáveis independentes que apresentaram efeito significativo no Pareto (Figura 5) para a viscosidade com aplicação do ANOVA. Mesmo a temperatura e o tempo sendo significativo no gráfico de Pareto, quando submetidas ao ANOVA, essas duas variáveis não foram amparadas pela análise de variância. Somente a variável amplitude foi amparada pela análise de variância, e assim empregou-se a equação (6) e elaborou-se a Figura 6 para definir quais seriam as melhores condições de amplitude a ser empregada no leite a ser submetido ao *spray dryer*, para apresentar valor de viscosidade que não venha a prejudicar o processo.

$$Y_{\text{viscosidade}} = 0,0010x^2 - 0,0885x + 9,7462 \quad (r^2 = 0,93) \quad (6)$$

Figura 6 – Variação da viscosidade em relação à diferentes valores de amplitude no modo normal de operação do ultrassom, fundamentada na equação quadrática.

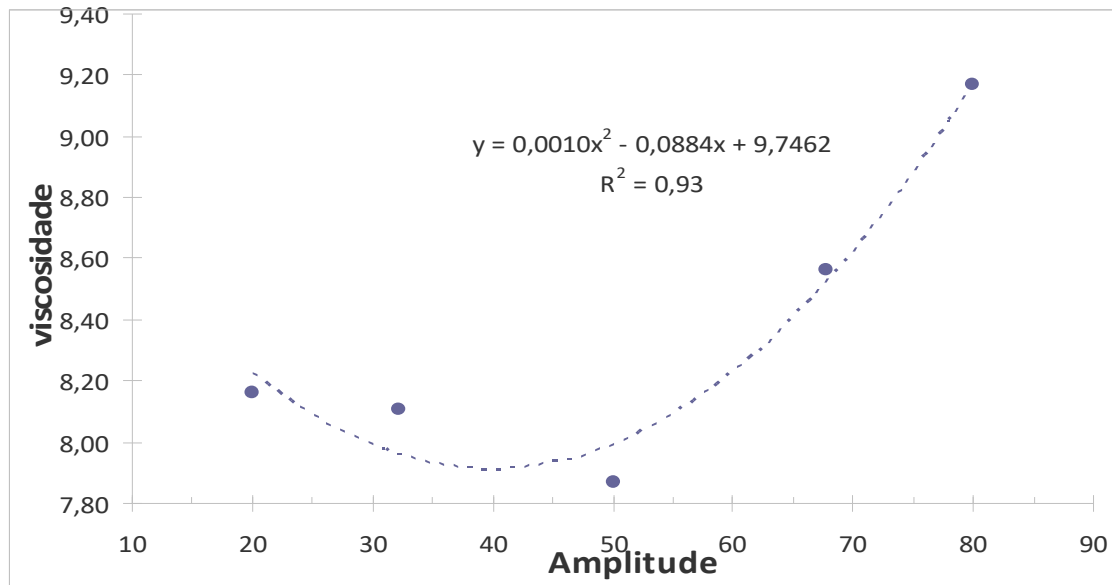
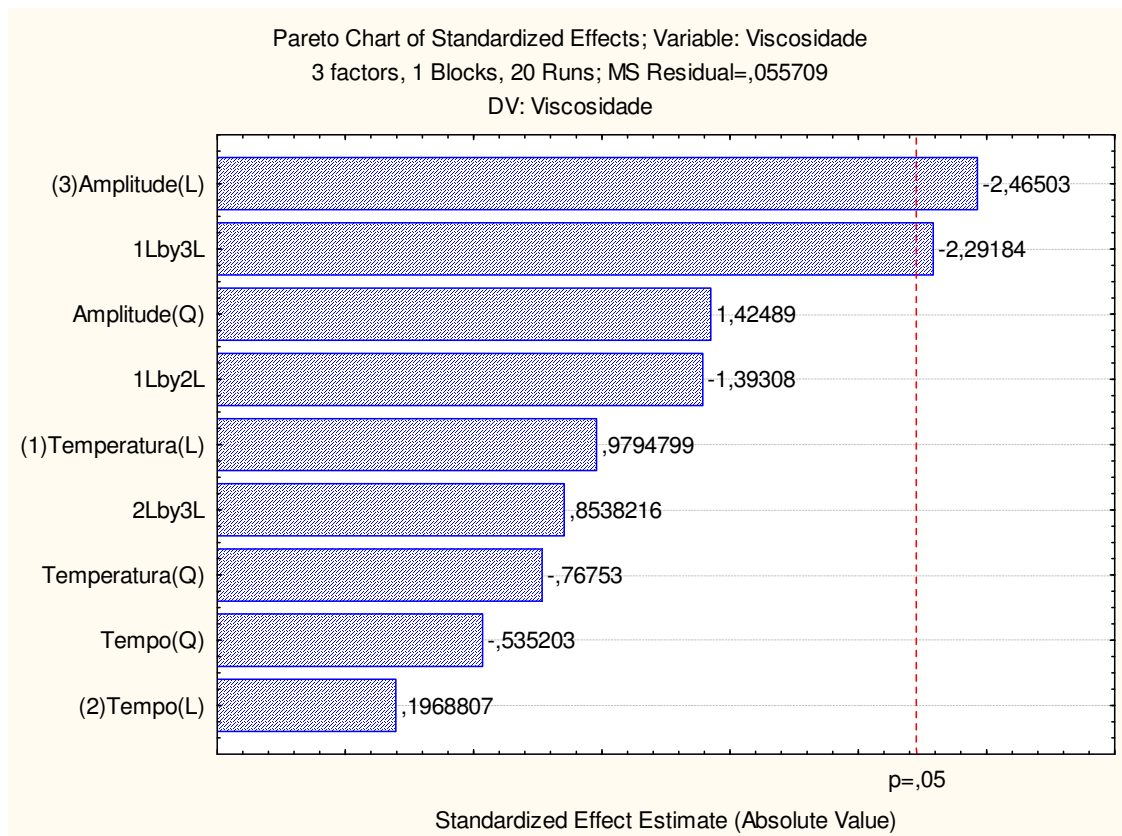


Figura 7 - Gráfico de Pareto para a variável viscosidade no modo de operação sweep de operação do ultrassom.



Mesmo que no modo de operação *sweep* do ultrassom, tenha ocorrido efeito significativo de forma linear para a amplitude e para interação temperatura na forma linear e amplitude linear, conforme relatado anteriormente na acidez (item 4.1.1), escolheu-se o modo de operação normal do ultrassom para tratar o leite a ser submetido ao processo de *spray dryer*, decorrente que no modo *sweep* de operação não ocorreu efeitos significativos das variáveis independentes na acidez (Figura 4).

4.1.3 pH

Os valores de pH obtidos nos diferentes modos de operação do ultrassom podem ser visualizados na tabela 4.

Tabela 4 - Valores de pH nos diferentes tratamentos em que foi submetido o leite concentrado a 20% e nos modos de operação normal e *sweep* do US a 25 kHz.

Número de ensaios	Fatores (Valores reais)			Variável Resposta	
	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Amplitude (%)	MODO NORMAL	MODO SWEEP
				pH	
1	12,53	7,67	32,14	6,51	6,47
2	32,47	7,67	32,14	6,48	6,45
3	12,53	24,33	32,14	6,51	6,44
4	32,47	24,33	32,14	6,47	6,42
5	12,53	7,67	67,86	6,50	6,41
6	32,47	7,67	67,86	6,47	6,45
7	12,53	24,33	67,86	6,51	6,40
8	32,47	24,33	67,86	6,46	6,36
9	5	16	50	6,47	6,47
10	40	16	50	6,42	6,45
11	22,5	2	50	6,46	6,43
12	22,5	30	50	6,49	6,32
13	22,5	16	20	6,48	6,44
14	22,5	16	80	6,46	6,30
15	22,5	16	50	6,48	6,44
16	22,5	16	50	6,45	6,31
17	22,5	16	50	6,48	6,33
18	22,5	16	50	6,45	6,49
19	22,5	16	50	6,45	6,51
20	22,5	16	50	6,47	6,48

A temperatura apresentou efeito significativo na forma linear (L) sobre o pH no modo de operação normal (Figura 8), enquanto que no modo de operação *sweep* nenhuma das variáveis independentes (temperatura, tempo e amplitude), influenciaram significativamente nos valores de pH (Figura 9).

Figura 8 - Gráfico de Pareto para a variável pH no modo de operação normal do ultrassom.

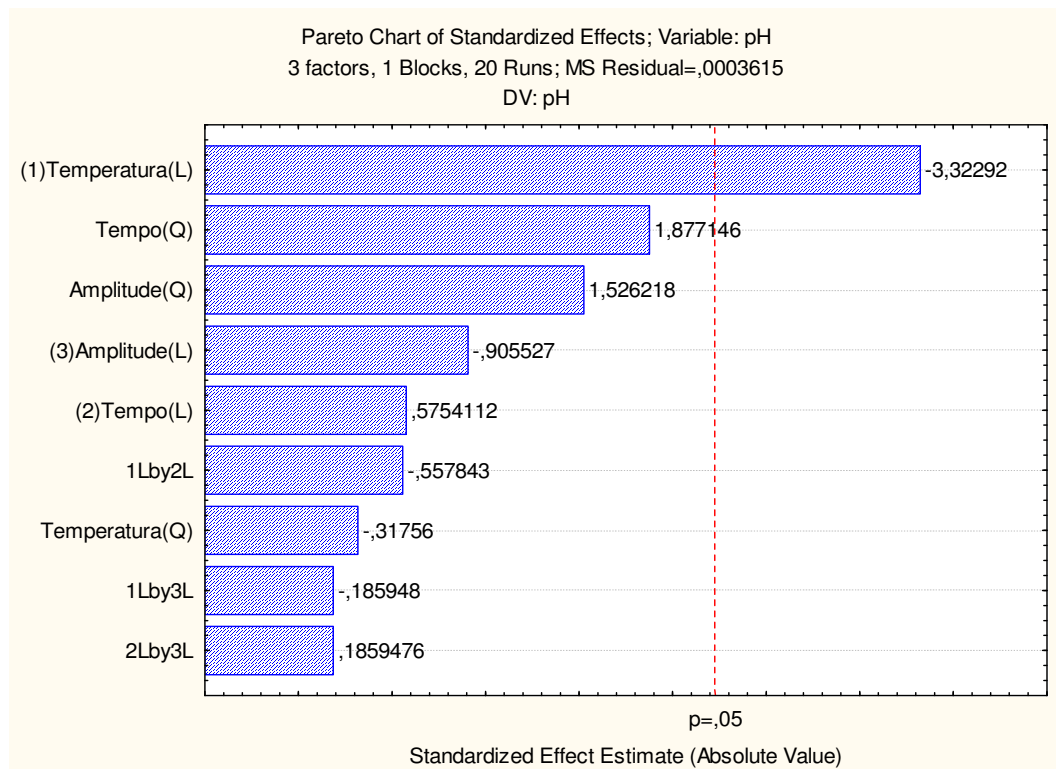
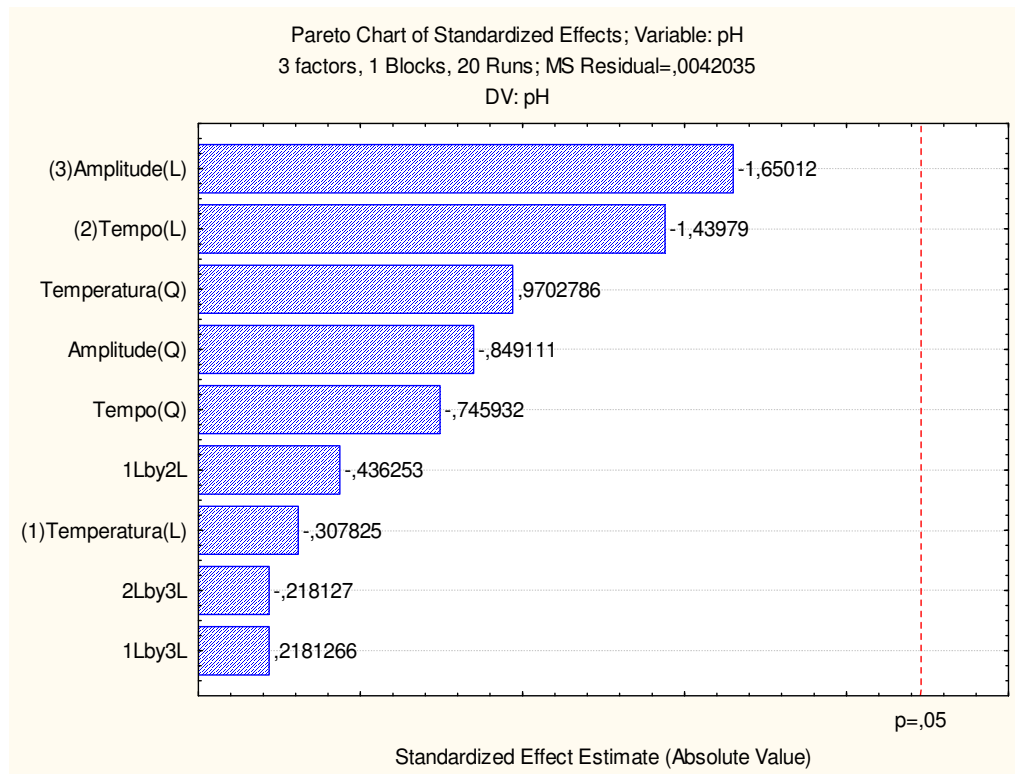


Figura 9 - Gráfico de Pareto para a variável pH no modo de operação *sweep* do ultrassom.



Chandrapala et al. (2012) observaram mudanças de pH em função do aumento do tempo de sonificação em amostras de leite desnatado fresco tratados a 20 kHz. Esse fato ocorreu devido o ultrassom promover a formação de pequenas quantidades de ácido nítrico, formado entre nitrogênio e oxigênio, na região onde ocorre a explosão das bolhas de cavitação, devido esse acontecimento promover aquecimento. Nos ensaios realizados nos dois modos de operação do US (Tabela 4), ocorreram variações nos valores de pH. Nas amostras tratadas no modo normal de operação, os quais foram influenciados pela variável temperatura na forma linear, o valor médio de pH dos leites antes de serem submetidos ao US no modo normal foi de 6,47 e o menor valor de pH ocorreu no ensaio 10 (pH 6,42), onde o valor de temperatura foi maior (40 °C) durante o tratamento com ultrassom.

A concentração do leite empregado na elaboração do leite em pó, a temperatura de reconstituição do leite em pó, e a acidificação influenciam na solubilidade e na estabilidade térmica das proteínas, quando da reconstituição do leite em pó. Fato esse observado quando da reconstituição de leite em pó desnatado a 23 °C cujo pH inicial (6,6) foi modificado para 6,0. Eshpari, Tong e Corredig (2014)

observaram uma melhor solubilidade do leite em pó obtido de leite concentrado a 65% e não 85% a 23°C e em pH 6,2. Justificaram que nessa temperatura, a concentração e valor de pH, o teor de material sérico permitiram a aproximação adicional de micelas de caseínas, e isso facilitou as interações caseína-caseína, agindo também no aumento de viscosidade no modo normal conforme já apresentado acima.

Valores ácidos de pH influenciam também no equilíbrio mineral do leite, e podem afetar a composição das micelas de caseínas, que podem vir formar agregados, e conseqüentemente problemas de solubilidade do leite em pó quando de sua solubilização (CHANDRAPALA et al., 2012). Dessa maneira é muito importante que o leite concentrado empregado na obtenção de leite em pó, apresente pH acima de 6,20. O pH médio dos leites concentrados empregados antes de serem submetidos aos diferentes tratamentos de US foi de 6,47 para o modo de operação normal e 6,40 para o modo de operação *sweep*, tendo em vista que o leite testado nos diferentes momentos foram de diferentes bateladas, esses valores não foram prejudiciais no experimento. Os valores de pH dos tratamentos 12,14, 16 e 17 do modo *sweep* já sem aplicação de US apresentaram valor médio de pH de 6,31. Após submetidos aos tratamentos de US no modo de operação *sweep* o pH variou de 6,31 a 6,51 enquanto que no modo normal variou entre 6,42 a 6,51 (Tabela 4). Demonstrando que os diferentes tratamentos de US empregados nos leites concentrados, não promoveram modificações significativas e dessa maneira se esses leites fossem transformados em leite em pó, não ocorreriam problemas na solubilidade das proteínas e no equilíbrio dos minerais quando da reconstituição dos mesmos.

4.1.4 Insolubilidade

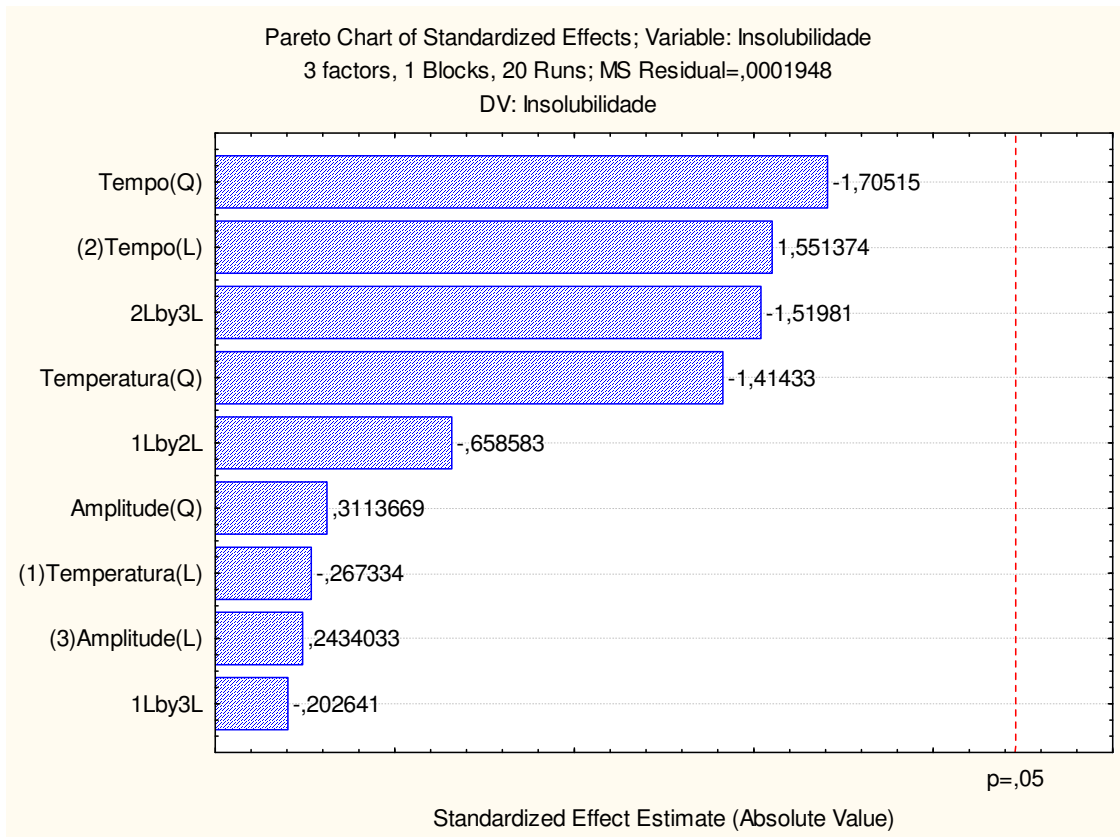
Os valores de insolubilidade obtidos nas diferentes amostras tratadas nos diferentes modos de operação do ultrassom a 25 kHz podem ser visualizados na tabela 5.

Tabela 5 - Valores de insolubilidade nos diferentes tratamentos em que foi submetido o leite concentrado a 20% nos modos de operação normal e *sweep* do ultrassom a 25 kHz.

Número de ensaios	Fatores (Valores reais)			Variável Resposta	
	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Amplitude (%)	MODO NORMAL	MODO SWEEP
				Insolubilidade (g)	
1	12,53	7,67	32,14	0,008	0,170
2	32,47	7,67	32,14	0,015	0,130
3	12,53	24,33	32,14	0,048	0,010
4	32,47	24,33	32,14	0,045	0,020
5	12,53	7,67	67,86	0,009	0,115
6	32,47	7,67	67,86	0,015	0,020
7	12,53	24,33	67,86	0,022	0,070
8	32,47	24,33	67,86	0,012	0,021
9	5	16	50	0,017	0,022
10	40	16	50	0,009	0,021
11	22,5	2	50	0,010	0,025
12	22,5	30	50	0,010	0,014
13	22,5	16	20	0,010	0,060
14	22,5	16	80	0,052	0,017
15	22,5	16	50	0,042	0,063
16	22,5	16	50	0,029	0,010
17	22,5	16	50	0,034	0,009
18	22,5	16	50	0,025	0,021
19	22,5	16	50	0,029	0,012
20	22,5	16	50	0,022	0,010

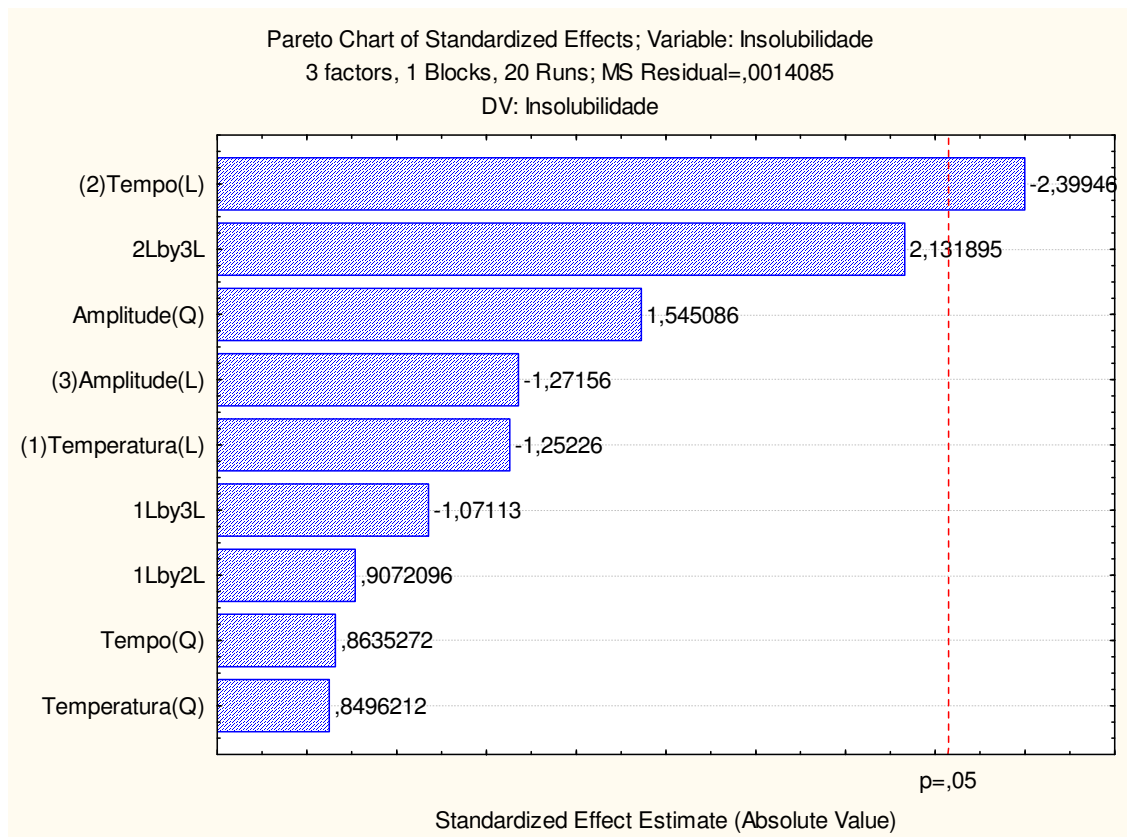
Nenhuma das variáveis independentes estudadas (temperatura, tempo e amplitude) influenciou significativamente nos valores de insolubilidade no modo normal de operação do ultrassom (Figura 10).

Figura 10 - Gráfico de Pareto para a variável insolubilidade no modo de operação normal do ultrassom.



No modo de operação *sweep* o tempo de exposição ao US apresentou efeito significativo de forma linear (L) na insolubilidade (Figura 11).

Figura 11 - Gráfico de Pareto para a variável insolubilidade no modo de operação *sweep* do ultrassom.



As alterações que ocorrem na composição das proteínas do leite, são resultantes de fatores como temperatura, tempo de exposição ao calor e pH, que promovem insolubilidade dessas proteínas (YE; SINGH, 2010). O modo de operação normal do US (Tabela 5) promoveu maior ação nas proteínas no leite concentrado, pois apresentou 13 experimentos com os menores valores de insolubilidade, enquanto que no modo de operação *sweep* os valores de insolubilidade diminuíram conforme aumentou o tempo de exposição ao US.

4.1.5 Cor

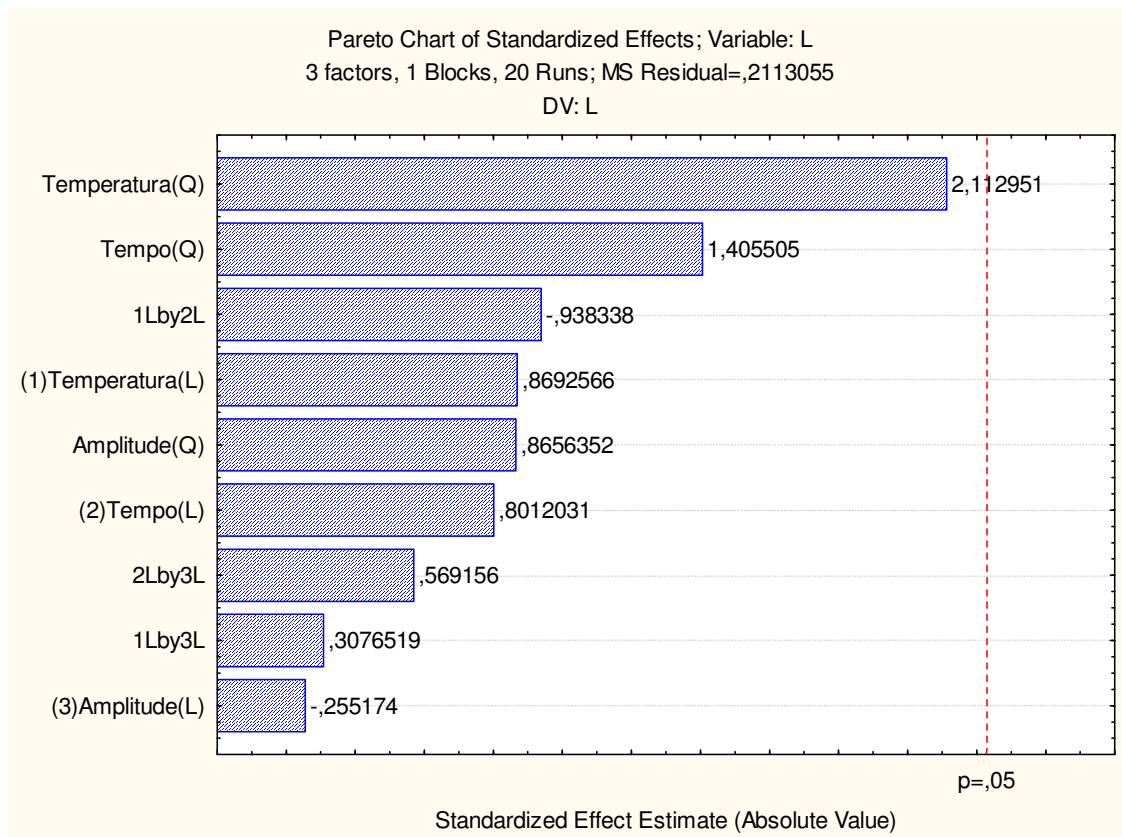
Os valores de L^* obtidos nas diferentes amostras tratadas nos diferentes modos de operação do ultrassom a 25 kHz podem ser visualizados na tabela 6.

Tabela 6 - Valores de L* nos diferentes tratamentos em que foi submetido o leite concentrado a 20% nos modos de operação normal e *sweep* do ultrassom a 25 kHz.

Número de ensaios	Fatores (Valores reais)			Variável Resposta	
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Amplitude (%)	MODO NORMAL	MODO SWEEP
				Luminosidade (L*)	
1	12,53	7,67	32,14	86,59	85,84
2	32,47	7,67	32,14	86,95	86,11
3	12,53	24,33	32,14	86,51	87,62
4	32,47	24,33	32,14	86,50	87,34
5	12,53	7,67	67,86	86,61	86,61
6	32,47	7,67	67,86	87,41	87,37
7	12,53	24,33	67,86	87,14	86,25
8	32,47	24,33	67,86	87,09	86,83
9	5	16	50	87,32	86,62
10	40	16	50	87,55	86,80
11	22,5	2	50	86,70	86,80
12	22,5	30	50	87,70	86,43
13	22,5	16	20	87,65	86,53
14	22,5	16	80	86,38	86,59
15	22,5	16	50	86,58	86,48
16	22,5	16	50	86,32	86,51
17	22,5	16	50	86,46	86,63
18	22,5	16	50	86,50	86,89
19	22,5	16	50	86,47	86,99
20	22,5	16	50	86,59	86,82

Nenhuma das variáveis independentes (temperatura, tempo e amplitude) apresentou influência significativa nos valores de L* no modo normal de operação do ultrassom (Figura 12).

Figura 12 - Gráfico de Pareto para a variável L* no modo de operação normal do ultrassom.



No modo *sweep* de operação do ultrassom a interação tempo e amplitude na forma linear, apresentaram efeito significativo no L* (Figura 13).

Figura 13 - Gráfico de Pareto para a variável L* no modo de operação *sweep* do ultrassom.

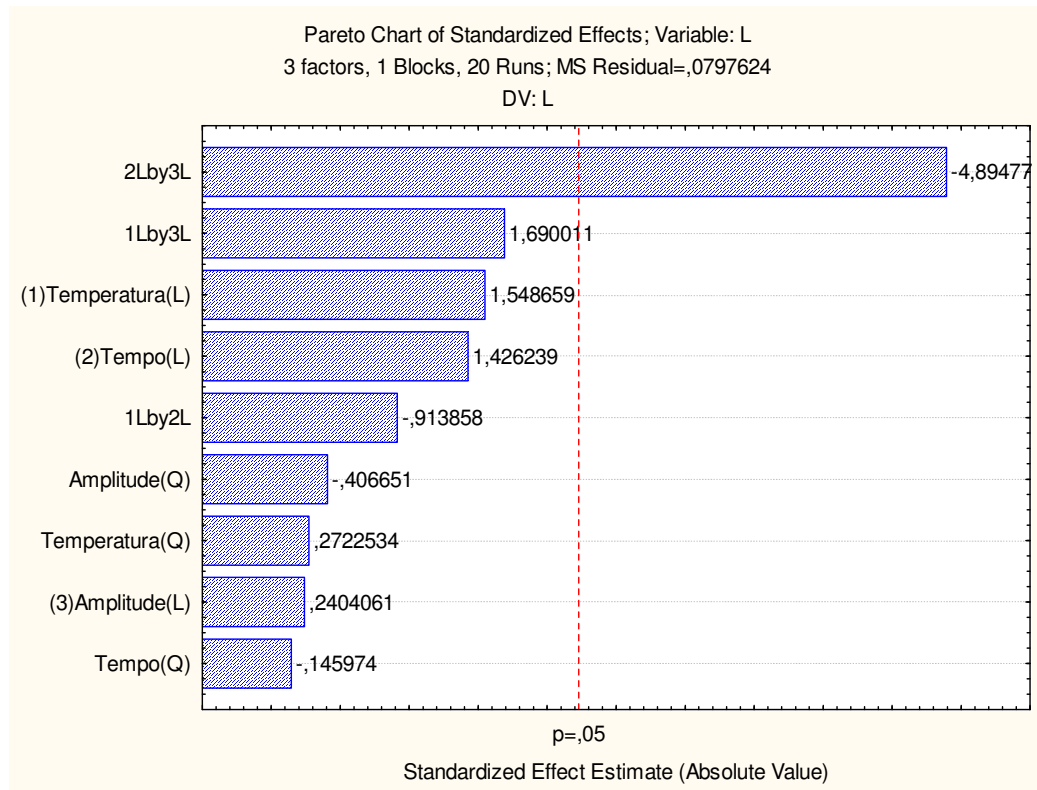
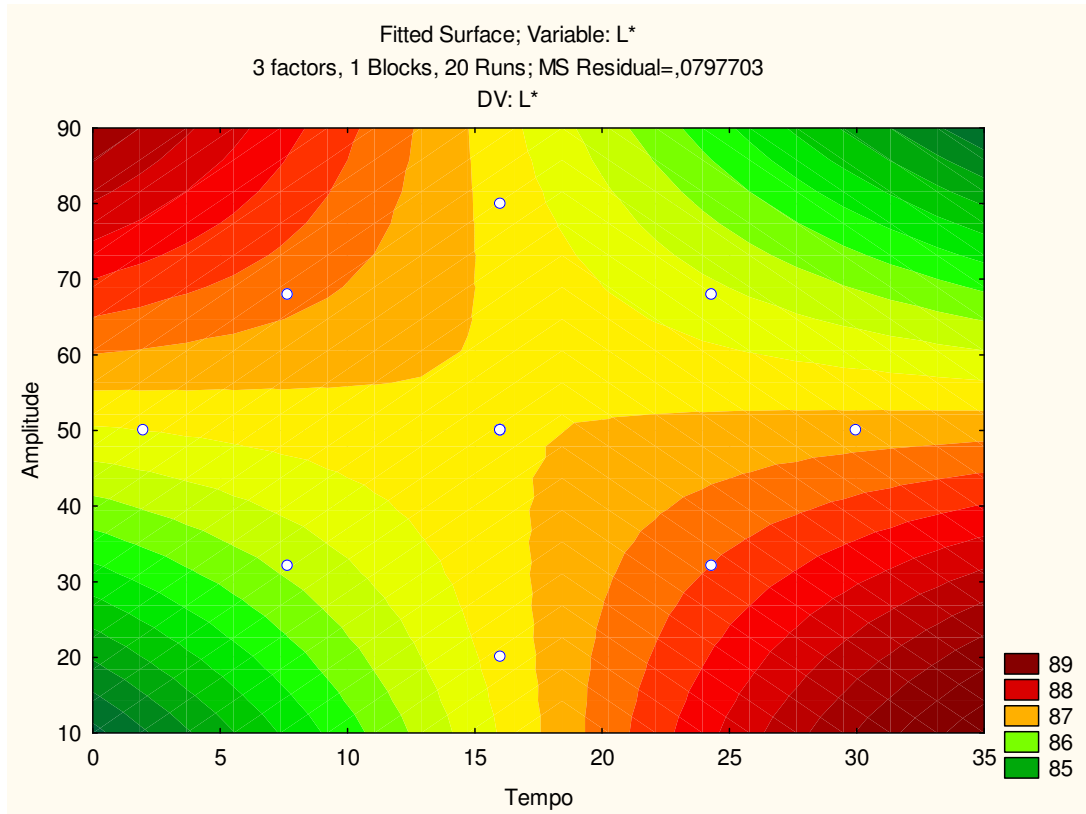


Figura 14 – Efeito da interação tempo com amplitude na luminosidade (L^*) do leite concentrado a 20% tratado a 25 kHz na temperatura 22,5°C no modo de operação *sweep* do ultrassom.



Como a interação tempo X amplitude foi significativa, temos duas possibilidades de termos altos valores de L^* . Uma das possibilidades é no intervalo de tempo entre 25 a 35 minutos e amplitude entre 10 a 30% (Figura 14). A outra possibilidade seria no tempo de 5 minutos num intervalo de amplitude entre 75 a 90%. Em estudo realizado por Bermúdez-Aguirre et al. (2009), leite integral foi submetido a pasteurização a 63 °C durante 30 minutos, pelo método tradicional e pelo ultrassom a 24 kHz, 400 W em diferentes amplitudes (0, 30%, 60%, 90% e 100%). Após foram armazenados a 4°C durante 16 dias, e durante esse período foram analisados pH, acidez, cor e análise microbiológica. Todas as amostras tratadas com US apresentaram maiores valores de L^* quando comparadas ao leite pasteurizado pelo método tradicional. As maiores amplitudes empregadas resultaram valores de L^* maiores, decorrente do aumento da cavitação, que promoveria homogeneização no leite (redução do tamanho do glóbulo de gordura).

Trabalho realizado por Bermúdez-Aguirre, Mawson e Barbosa-Cánovas (2008) comparando leite cru, leite aquecido e leite tratado com US verificou variação

importante em relação aos valores de L^* comparando leite cru e leite tratado com US. A cor mais branca do leite observada nas amostras após a termossonificação confirmou resultados maiores de L^* , significando uma maior luminosidade da amostra. Esse valor poderia estar relacionado com a melhor homogeneização observada nas amostras após tratamento. Glóbulos de gordura menores são produzidos por cavitação, e aparentemente cria uma amostra mais uniforme, ou seja, a homogeneização por cavitação poderia ser obtida pela formação de partículas menores de gordura que às vezes são presente no leite cru.

Em relação aos dois modos de operação entre si, no modo normal em 9 ensaios os valores de L^* foram maiores do que no modo *sweep*, e em apenas um ensaio (5) os valores foram iguais (Tabela 6), demonstrando que a homogeneização dos glóbulos de gordura promovida pela cavitação, não ocorreu em todas as condições estudadas. Não se tem informações científicas até o momento se essa homogeneização promovida pelo US no leite possa influenciar na secagem do leite, por esse motivo deve-se avaliar com mais profundidade o efeito da amplitude e tempo de US aplicados na cor (L^*).

4.2. ESCOLHA DAS CONDIÇÕES DE TRATAMENTO DE ULTRASSOM A SEREM EMPREGADAS NO LEITE CONCENTRADO QUE FOI POSTERIORMENTE SECADO EM *SPRAY DRYER*

Fundamentado em vários trabalhos científicos (BARTHOLOMAI, 1991; BRASIL, 1996; OLIVEIRA et al., 2000; FOX e BRODKORB, 2008; CAMERON, MCMASTER e BRITZ, 2009; YAZDANPANA e LANGRISH, 2011; SHANMUGAM, CHANDRAPALA e ASHOKKUMAR, 2012; CHANDRAPALA et al., 2012; ZISU, SCHLEYER e CHANDRAPALA, 2013; SAFFARI e LANGRISH, 2014), chegou-se à conclusão que as variáveis dependentes que mais tem importância na obtenção do leite em pó são a acidez (4.1.1) e a viscosidade (4.1.2). E fundamentado nos resultados obtidos em ambas as variáveis, nos modos de operação do ultrassom optou-se pelo modo de operação normal.

As condições das variáveis independentes a serem aplicadas no leite concentrado a ser submetido ao *spray dryer*, após estudo dos dados foram: amplitude 50%, temperatura 5°C e tempo de 16 minutos, correspondentes ao ensaio

número 9, decorrente que o mesmo apresentou os melhores resultados para as variáveis acidez e viscosidade.

4.3. LEITE EM PÓ E LEITE RECONSTITUÍDO

4.3.1 Atividade de água e umidade

Os resultados de atividade de água (a_w) e umidade dos leites em pó integral obtidos dos diferentes tratamentos aplicados, e durante armazenamento em diferentes temperaturas de estocagem são apresentados na tabela 7 e na figura 15.

Tabela 7 - Valores de aw e umidade de leite em pó integral obtidos de diferentes tratamentos e armazenados a 25, 35 e 45°C a 76% UR durante 120 dias.

Análise	Tratamento	Temp. (°C) armazenamento	DIAS DE ARMAZENAMENTO					EPM	Sig.
			1	30	60	90	120		
aW	AB	25	0,350 ^{CA}	0,355 ^{CD}	0,327 ^{DF}	0,400 ^{AD}	0,370 ^{BF}	0,001	***
		35	0,350 ^{dA}	0,362 ^{cdD}	0,370 ^{CD}	0,442 ^{bC}	0,655 ^{aC}	0,003	***
		45	0,350 ^{eA}	0,630 ^{dA}	0,677 ^{cA}	0,727 ^{bB}	0,797 ^{aA}	0,004	***
	LUS	25	0,322 ^{dC}	0,337 ^{cE}	0,347 ^{bcE}	0,395 ^{aD}	0,355 ^{bF}	0,003	***
		35	0,322 ^{eC}	0,360 ^{dD}	0,395 ^{cC}	0,445 ^{bC}	0,575 ^{aE}	0,003	***
		45	0,322 ^{eC}	0,560 ^{dB}	0,675 ^{cA}	0,740 ^{bA}	0,767 ^{aB}	0,003	***
	SUS	25	0,340 ^{cbB}	0,330 ^{cE}	0,327 ^{cF}	0,395 ^{aD}	0,355 ^{bF}	0,004	***
		35	0,340 ^{eB}	0,355 ^{dD}	0,390 ^{cC}	0,437 ^{bC}	0,632 ^{aD}	0,004	***
		45	0,340 ^{eB}	0,437 ^{dC}	0,655 ^{cB}	0,752 ^{bA}	0,780 ^{aAB}	0,003	***
		EPM		0,002	0,003	0,002	0,004	0,005	
		Sig		***	***	***	***	***	
	Umidade (%)	AB	25	2,225 ^{eA}	2,400 ^{dE}	2,600 ^{cE}	2,900 ^{bD}	3,625 ^{aE}	0,050
35			2,225 ^{eA}	2,725 ^{dD}	3,125 ^{cC}	4,220 ^{bC}	5,325 ^{aD}	0,057	***
45			2,225 ^{dA}	4,875 ^{cA}	5,125 ^{cA}	6,350 ^{bA}	7,350 ^{aA}	0,108	***
LUS		25	2,250 ^{dA}	2,967 ^{bC}	2,825 ^{cD}	3,000 ^{bD}	3,320 ^{aE}	0,035	***
		35	2,250 ^{eA}	3,000 ^{dC}	3,700 ^{cB}	4,275 ^{bC}	5,012 ^{aD}	0,053	***
		45	2,250 ^{eA}	4,750 ^{dA}	5,250 ^{cA}	6,200 ^{bAB}	6,475 ^{aB}	0,047	***
SUS		25	2,275 ^{dA}	2,625 ^{cD}	2,700 ^{cDE}	2,900 ^{bD}	3,350 ^{aE}	0,044	***
		35	2,275 ^{eA}	2,950 ^{dC}	3,625 ^{cB}	4,150 ^{bC}	5,125 ^{aD}	0,052	***
		45	2,275 ^{dA}	4,150 ^{cB}	5,075 ^{bA}	6,025 ^{aB}	6,125 ^{aC}	0,118	***
		EPM		0,057	0,042	0,056	0,076	0,099	
		Sig		n.s.	***	***	***	***	

^{A-F} As letras minúsculas/maiúsculas diferentes nas linhas/colunas indicam diferença estatística dentro do mesmo experimento pelo teste de Tukey, sendo que: letras minúsculas nas linhas indicam diferenças nos dias de armazenamento em relação a mesma temperatura; e letras maiúsculas nas colunas indicam diferença no dia de armazenamento em relação as diferentes temperaturas.

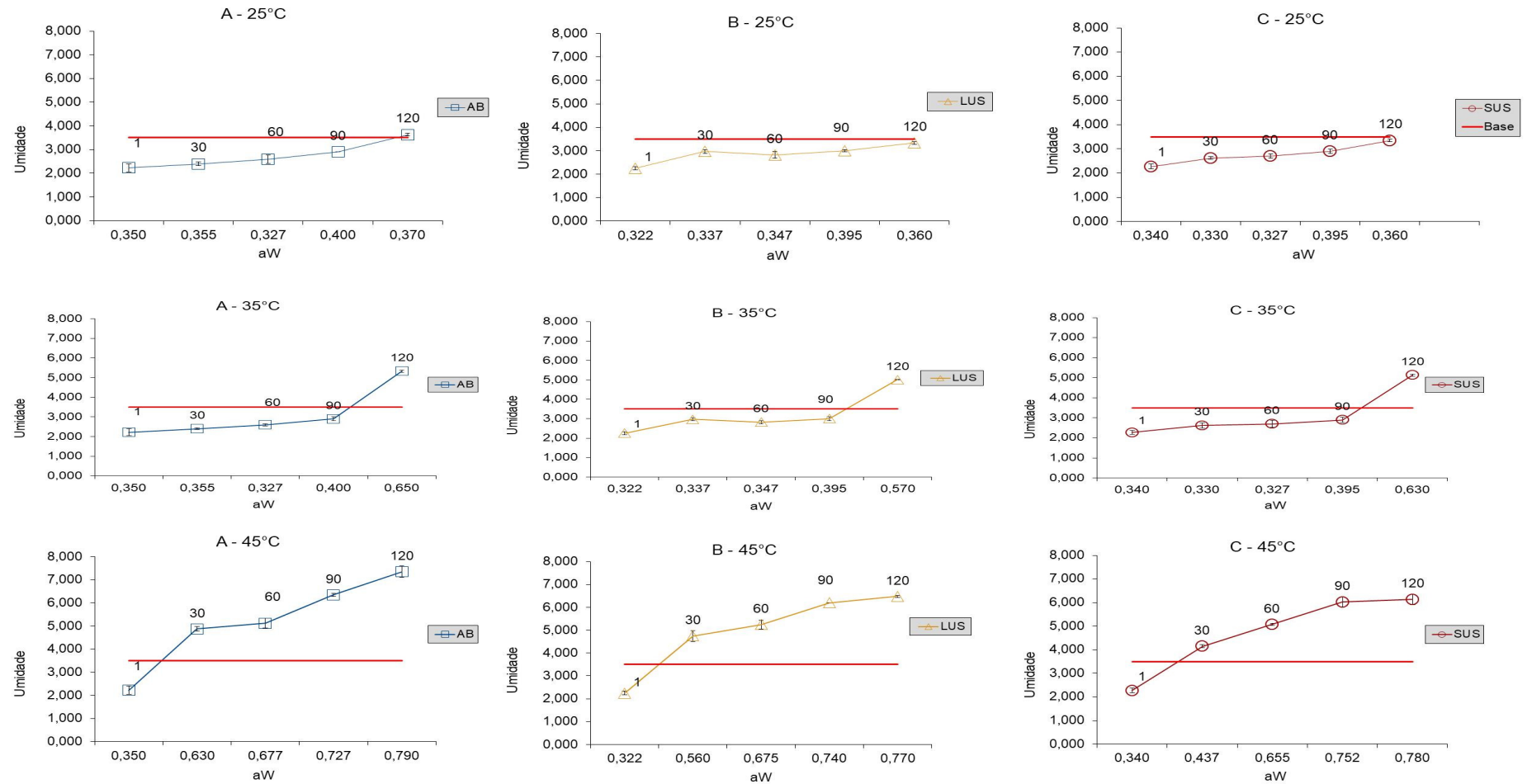
AB: amostra sem ultrassom e sem probióticos; LUS: amostra com ultrassom e com probióticos; SUS: amostra sem ultrassom e com probióticos.

EPM: Erro padrão da média.

Sig.: significância: *** (P<0,001); ** (P<0,01); * (P<0,05); n.s. (não significativo)

O leite em pó faz parte de um importante grupo de alimentos desidratados, onde a qualidade durante a armazenagem pode decair por mudanças geradas pelo crescimento microbiano e com reações enzimáticas, não enzimáticas e oxidativas. A lactose está presente em estado amorfo, não cristalino e metastável no leite em pó, e tende a absorver umidade. Isso resulta em uma plastificação do mesmo, o que aumenta a mobilidade molecular e pode ser traduzido em uma transição para estado cristalino podendo acelerar mudanças degenerativas (JOUPIILLA; ROOS, 1994), sendo então a atividade de água e a umidade, propriedades que podem estar ligadas a esses aspectos degenerativos e indesejáveis no leite em pó, como por exemplo, a insolubilidade e o escurecimento que ocorreram principalmente nas amostras armazenadas a 45°C, as quais também apresentaram os valores mais elevados de atividade de água e umidade já a partir dos 30 dias de armazenagem.

Figura 15 – Valores de a_w e umidade (%) de leite em pó integral obtido de diferentes tratamentos estocados a 25, 35 e 45°C a 76% UR durante o período de 120 dias.



Valores com médias e desvio padrão.

AB: amostra sem ultrassom e sem probióticos; **LUS:** amostra com ultrassom e com probióticos; **SUS:** amostra sem ultrassom e com probióticos.

Trabalho realizado por Alves et al. (2008), compararam o desempenho de diferentes tipos de embalagens: poliéster metalizado + polietileno de baixa densidade; poliéster + polipropileno biorientado metalizado + polietileno de baixa densidade com 75 micras e lata de aço na qualidade do leite em pó integral durante 12 meses de estocagem em três condições controladas de temperatura e umidade relativa (25°C/75%UR; 35°C/50%UR; 35°C/90%UR). Verificaram aumento gradativo nos valores da atividade de água do leite em pó integral no decorrer do armazenamento, mais acentuadamente nas estruturas compostas por poliéster metalizado e polietileno de baixa densidade estocado a 90% e 75% de umidade relativa. Esse fato estaria relacionado a maior permeabilidade ao vapor d'água desse tipo de embalagem quando comparado a embalagem com polipropileno biorientado metalizado e latas de aço. Segundo esse estudo o aumento da atividade de água do leite em pó integral foi decorrente da transferência de vapor d'água através da embalagem, devido à permeação pelo material de embalagem ou problemas de selagem das embalagens. O leite em pó integral foi embalado em poliéster metalizado + polietileno de baixa densidade (75 micras) e apresentou aumento nos valores de aw e umidade (Tabela 7) principalmente a 35 e 45°C a 76% UR. Demonstrando que esse tipo de embalagem empregada não é aconselhável que seja utilizada nessas temperaturas para o leite em pó, por ocorrer maior permeabilidade ao vapor de água.

Os valores de aw nas amostras estocadas a 45°C, nos 30 dias de armazenagem, foram maiores ($P < 0,001$) quando comparados as amostras armazenadas a 25° e 35°C (Tabela 7).

Para Van Mil e Jans (1991) a umidade em leite em pó integral ao sair do *spray dryer* deve ser menor do que 2,8%, decorrente que esse valor baixo de umidade vai proporcionar longo tempo de vida útil, se armazenado esse leite a temperatura menor de 20°C, e se colocado em embalagens com reduzida permeabilidade ao oxigênio e principalmente a umidade. Os leites em pó integrais pertencentes aos tratamentos AB, LUS e SUS apresentaram valores de umidade após saída do *spray dryer* de 2,22%, 2,25% e 2,27% respectivamente (Tabela 7 e Figura 15), dessa maneira quando armazenados a 25°C apresentaram tempo de vida útil de 120 dias. O mesmo não ocorreu

quando armazenados a 35°C que apresentaram 90 dias de vida útil, e em 45°C que apresentaram menos de 30 dias de vida útil.

A legislação brasileira prevê limite máximo de 3,5% de umidade em leite em pó integral (BRASIL, 1996). Nos três tratamentos realizados (AB, LUS e SUS) a 25°C o valor de 3,5% somente ocorreu no 120º dia de armazenamento, em 35°C isso ocorreu após 90 dias de armazenamento, enquanto que a 45°C antes dos 30 dias de armazenamento (Tabela 7, Figura 15), demonstrando que a embalagem empregada no trabalho não funcionou como uma boa barreira de proteção do leite em pó integral, quando o mesmo foi armazenado em temperaturas superiores a 30°C no valor de 76 UR%.

Em testes realizados por Perrone et al. (2013), avaliou-se diferentes condições empregadas no *spray dryer* (vazão do produto, do ar e da temperatura do ar de entrada no equipamento) na secagem de leite em pó integral, e suas consequências em relação aos valores de umidade e atividade de água. Concluíram que embora o valor de umidade estipulado pela legislação brasileira seja atingido (3,5%), as condições empregadas no processo de secagem podem ser classificadas como inadequadas, para serem aplicadas, quando o valor de atividade de água apresentado pelo leite em pó seja superior a 0,2. Na secagem do leite concentrado a 20% empregou-se vazão de produto de 0,8 litros/hora, vazão de ar de 40 litros/minuto, temperatura do ar de entrada de 106°C. E essas condições proporcionaram valor inicial de atividade de água variando entre 0,322 a 0,350, indicando que essas condições empregadas na secagem do leite concentrado a 20% no *spray dryer* foram inadequadas (Tabela 7). Testes deveriam ser realizados variando as condições de vazão do produto, do ar e da temperatura do ar de entrada no equipamento de forma a atingir uma atividade de água máxima de 0,2 no momento da fabricação.

Valor de atividade de água inicial de 0,37 em leite em pó integral, informa que a transição vítrea nesse leite ocorre em 24°C (Roos, 2002), enquanto que valores de atividade de água de 0,31 esta relacionado a 35°C e valores de 0,30 a 45°C (Thomsen et al., 2005). O armazenamento desses leites em pó, em temperaturas acima de onde ocorre a transição vítrea, promoverá nesses leites, modificações químicas indesejáveis. Os três tipos de leites em pó obtidos (AB, LUS e SUS) pelos valores iniciais de atividade de água apresentados (0,35; 0,32 e 0,35 respectivamente, Tabela 7), poderiam ser

armazenados somente em temperatura de 25 °C, sem que ocorressem reações químicas indesejáveis.

4.3.2 Luminosidade (L*)

A partir do valor de L* foi possível mensurar o valor do brilho, ou mais especificamente, as mudanças no brilho das amostras de leite em pó integral em relação às diferentes temperaturas e tempos de estocagem (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores de luminosidade (L^*) de leite em pó integral obtido de diferentes tratamentos (AB, LUS e SUS) e armazenados a 25, 35 e 45 °C durante 120 dias.

Análise	Tratamento	Temp. (°C) armaz.	DIAS DE ARMAZENAMENTO					EPM	Sig.
			1	30	60	90	120		
Cor (L^*) em leite em pó	AB	25	64,34 ^{aAB}	63,86 ^{abA}	62,09 ^{bA}	59,45 ^{cd}	64,81 ^{ab}	0,78	***
		35	64,34 ^{aAB}	62,27 ^{bcAB}	61,86 ^{bcA}	62,76 ^{abB}	60,72 ^{cC}	0,70	***
		45	64,34 ^{aAB}	61,06 ^{bBC}	54,72 ^{cC}	51,74 ^{dF}	45,88 ^{eD}	0,57	***
	LUS	25	62,48 ^{bB}	59,59 ^{cdD}	58,93 ^{dB}	60,65 ^{bCD}	68,35 ^{aA}	0,45	***
		35	62,48 ^{aB}	61,34 ^{aBC}	62,07 ^{aA}	61,25 ^{aBC}	61,29 ^{aC}	0,53	n.s.
		45	62,48 ^{aB}	58,29 ^{bD}	53,62 ^{cC}	47,07 ^{dG}	44,69 ^{edD}	0,51	***
	SUS	25	65,28 ^{aA}	62,87 ^{bAB}	58,90 ^{CB}	64,94 ^{aA}	64,56 ^{aB}	0,46	***
		35	65,28 ^{aA}	61,13 ^{bBC}	60,83 ^{bA}	60,69 ^{bCD}	61,54 ^{bC}	0,86	***
		45	65,28 ^{aA}	62,51 ^{bAB}	57,93 ^{CB}	53,88 ^{dE}	45,53 ^{eD}	0,81	***
		EPM		0,64	0,64	0,50	0,49	0,91	
		Sig		**	***	***	***	***	

^{A-G}As letras minúsculas/maiúsculas diferentes nas linhas/colunas indicam diferença estatística dentro do mesmo experimento pelo teste de Tukey, sendo que: letras minúsculas nas linhas indicam diferenças nos dias de armazenamento em relação a mesma temperatura; e letras maiúsculas nas colunas indicam diferença no dia de armazenamento em relação as diferentes temperaturas.

AB: amostra sem ultrassom e sem probióticos; LUS: amostra com ultrassom e com probióticos; SUS: amostra sem ultrassom e com probióticos.

EPM: Erro padrão da média.

Sig.: significância: *** (P<0,001); ** (P<0,01); * (P<0,05); n.s. (não significativo)

Os dados indicam que com 30 dias de armazenagem, todos os tratamentos estocados sob diferentes temperaturas tiveram os valores de luminosidade diminuídos, a grande maioria de forma significativa quando comparados aos valores no dia de fabricação dos produtos. Aos 60 dias de armazenamento, grande maioria das amostras a 25 e 35°C, apresentaram diminuição do valor de L* (62,09; 61,86; 58,93; 58,90; 60,83), ou então não apresentaram diferença significativa quando comparado aos valores de 30. Aos 90 e 120 dias de armazenagem algumas amostras dos diferentes tratamentos armazenadas a 25°C e 35°C apresentaram aumento nos valores de luminosidade, de forma mais expressiva nas amostras a 25°C nas amostras sem US e sem probióticos nos 120 dias (64,81), amostras com US e com probióticos nos 90 dias (60,65) e 120 dias (68,35) e nas amostras sem US e com probióticos nos 90 dias (64,94).

As amostras de todos os tratamentos armazenados a 45°C, as quais apresentaram os menores resultados de L* (61,06; 54,72; 51,74; 45,88; 58,29; 53,62; 47,07; 44,69; 62,51; 57,93; 53,88; 45,53) a partir dos 30 dias de estocagem (Tabela 8), visivelmente apresentavam nesse período coloração marrom escura, resultado da reação de *Maillard*. Reação essa que ocorre entre proteínas e açúcares redutores em alimentos processados termicamente, envolvendo principalmente o aminoácido lisina, afetando o valor nutricional do produto pelo bloqueio desse aminoácido na digestão (GONZALES et al., 2010).

A intensidade da reação de *Maillard* nas amostras armazenadas a 45°C pode ser explicada, pela temperatura de estocagem, juntamente com os valores de atividade de água mais elevados (0,630; 0,677; 0,727; 0,797; 0,560; 0,675; 0,740; 0,767; 0,437; 0,655; 0,752; 0,780) (Tabela 7), já que as taxas de reações de deterioração e estabilidade durante o armazenamento estão relacionadas aos valores de atividade de água dos alimentos, e ocorrem principalmente no intervalo de 0,5 a 0,75, valores esses encontrados nas amostras armazenadas a 45°C e a 35°C nos 120 dias de estocagem (GONZALES et al., 2010).

Perda de lisina disponível foi avaliada com o objetivo de verificar a influência da atividade de água na cinética da reação de *Maillard* em leite em pó desnatado por Gonzales et al. (2010). Amostras liofilizadas de 10 g de leite em pó desnatado a 20% com 0,06% de sorbato de potássio foram equilibradas

a 25°C em dessecadores a vácuo sobre soluções salinas saturadas com diferentes valores de atividade de água. As experiências foram realizadas em três temperaturas: 37, 50 e 60°C. Aos 37°C, perdas extensas foram notadas depois de alguns dias de armazenamento nos valores máximos analisados. Quando leite em pó foi armazenado em aw inicial de 0,47, houve uma perda de 20% de lisina após 7 dias, valores correspondentes a menos de 30 dias de armazenagem a temperatura de 45°C. Embora não foram avaliados os teores de lisina nas amostras armazenadas nas diferentes temperaturas, a perda de lisina bem provável tenha ocorrido pelas alterações significativas de coloração características das reações de *Maillard*, principalmente nas amostras armazenadas a 45°C, acompanhadas pelos elevados teores de aw avaliados no decorrer do armazenamento nessa temperatura (Tabela 7).

As amostras de leite em pó tratadas com US armazenadas a 45°C desde o dia da fabricação já apresentavam resultados de luminosidade menores (62,48) do que os valores dos outros tratamentos AB (64,34) e SUS (65,28), efeito esse apresentado até os 120 dias de estocagem.

Nos 120 dias de armazenagem quando comparadas as amostras dos diferentes tratamentos a 25, 35 e 45°C foi possível detectar diferença aparente de cor em todas as amostras armazenadas a 45°C de todos os tratamentos, as quais apresentavam coloração amarelada a marrom escura.

Embora nesse estudo não foi avaliado o valor b*, as amostras a 35°C de todos os tratamentos apresentavam visivelmente coloração mais amarelada comparada às de 25°C. Já as amostras de todos os tratamentos que ficaram a 45°C apresentaram coloração marrom escura

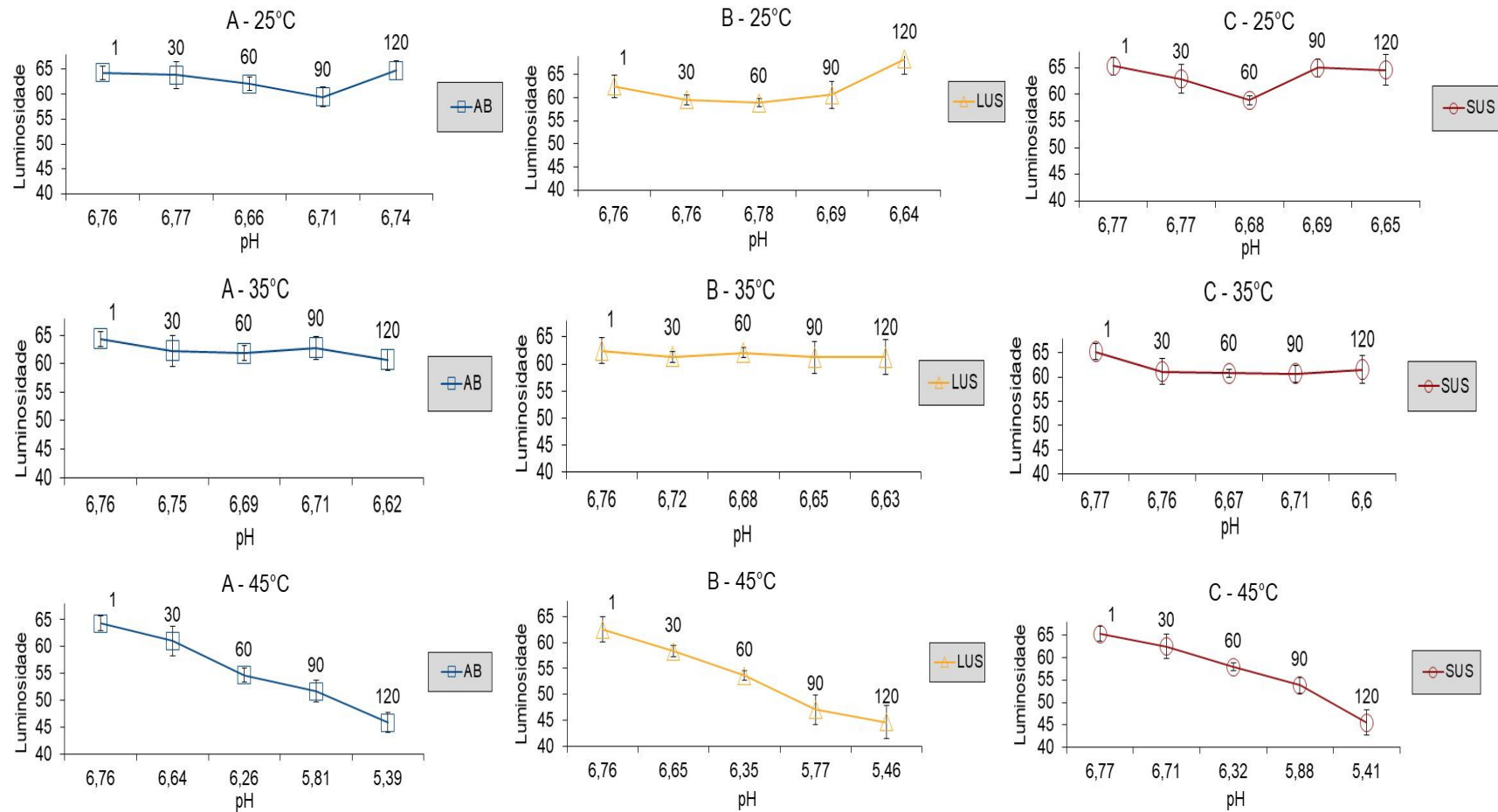
Leite reconstituído

4.3.3 Acidez e pH

Os resultados demonstraram um aumento nos valores de acidez do leite reconstituído (Tabela 9) até 30 dias e uma diminuição sequente de pH no decorrer do período de armazenagem nas amostras armazenadas a 45°C em todos os tratamentos estudados. Esses resultados poderiam ser justificados pela formação de CO₂ pela reação de *Maillard* nessas amostras conforme

estudo em leite em pó desnatado por Rehman, Farkye e Schaffner (2003), o qual observou resultados na diminuição dos valores de pH durante o armazenamento de leite em pó desnatado, fato esse que poderia ser resultado da evolução do CO_2 da reação de *Maillard* para ácido carbônico no decorrer do tempo de estocagem causando uma diminuição nos valores de pH. A correlação de valores de L^* e pH podem ser melhor visualizados na figura 16.

Figura 16 – Valores de L* e pH do leite reconstituído oriundo dos diferentes tratamentos de leite em pó estocados a 25, 35 e 45 °C durante os períodos de 1, 30, 60, 90 e 120 dias.



Valores com médias e desvio padrão.

AB: amostra sem ultrassom e sem probióticos; **LUS:** amostra com ultrassom e com probióticos; **SUS:** amostra sem ultrassom e com probióticos.

Nas amostras controle sem tratamento com US e sem probióticos armazenadas a 25°C houve aumento significativo ($P < 0,001$) de luminosidade aos 120 dias de armazenamento. Nas amostras tratadas e não tratadas com US e com probióticos mantidas a 25°C o aumento nos valores de luminosidade ocorreram a partir dos 60 dias de armazenamento. As amostras tratadas com US e com probióticos armazenadas a 35°C mantiveram resultados constantes de luminosidade, sem diferenças significativas no decorrer do tempo de armazenamento, o que não ocorreu com as amostras não tratadas com US e com probióticos e com as amostras controle, as quais ao longo do tempo de armazenamento apresentaram redução significativa nos valores de luminosidade.

Resultados semelhantes foram obtidos por Bermúdez-Aguirre et al., (2009) em relação ao pH e luminosidade. Eles avaliaram a eficiência do ultrassom a 24 kHz nas amplitudes de 0,40, 72, 108 e 120 μm a 63°C por 30 minutos na inativação de *Listeria innocua* e bactérias mesofílicas no leite cru, avaliando também os parâmetros pH, acidez e cor. Verificaram que conforme se dava o aumento das amplitudes, os valores de pH diminuía, a acidez e a luminosidade aumentavam, sendo a luminosidade resultante da quebra dos glóbulos de gordura (melhor homogeneização) e reagrupamento desses com as micelas de caseína em novos complexos.

As amostras tratadas com US no dia da fabricação apresentavam valores de acidez mais baixos (11,58) das amostras não tratadas (12,22 nas amostras sem US e com probióticos e 12,12 nas amostras sem US e sem probióticos), confirmando a primeira parte do estudo e a escolha do tratamento aplicado levando em consideração o parâmetro acidez. O menor valor de acidez se manteve aos 30 dias de armazenamento nas temperaturas de 25 e 35°C, embora sem diferença significativa dos tratamentos sem US e com probióticos e da amostra controle sem US e sem probióticos. Para as amostras armazenadas a 25 e 35°C a partir dos 60 dias de estocagem, o comportamento da acidez e pH se manteve estável em todos os tratamentos aplicados, com alguns casos de diminuição significativa ($P < 0,001$) nos valores de acidez, como no tratamento com US e com probióticos a 25°C (12,23 para 11,97) e na amostra controle sem US e sem probióticos a 25°C (12,05 para 11,52) e a 35°C (12,23 para 12,00 e 12,00 para 11,82). As amostras armazenadas a 45°C em todos os tratamentos tiveram aumento significativo ($P < 0,001$) nos valores de acidez e diminuição nos valores de pH no tempo 30. A partir dos 60 dias os

valores de acidez para todos os tratamentos foram diminuindo, assim como o pH continuou baixando até 120 dias. Para as análises de acidez eram retiradas amostras de 10 mL com pipeta volumétrica das amostras de leite reconstituído, sendo retiradas somente a parte líquida solúvel que ficava na camada superior, isso porque o teor de insolúveis já a partir dos 60 dias de armazenamento nas amostras que ficaram a 45°C ficavam separadas no fundo dos frascos, isso poderia explicar a diferença nos valores de acidez e pH, já que no caso do pH, a avaliação era feita com um volume maior de amostra de leite reconstituído e com os sólidos insolúveis presentes nas amostras.

Tabela 9 - Valores de acidez e pH do leite reconstituído oriundo dos diferentes tratamentos de leite em pó estocados a 25, 35 e 45 °C durante 120 dias.

Análise	Tratamento	Temp. (°C) armazen.	DIAS DE ARMAZENAMENTO					EPM	Sig.	
			1	30	60	90	120			
Acidez (°Dornic)	AB	25	12,12 ^{aA}	12,20 ^{aD}	12,23 ^{aCDE}	12,05 ^{aDE}	11,52 ^{bF}	0,09	***	
		35	12,12 ^{abA}	12,30 ^{aD}	12,23 ^{abCDE}	12,00 ^{bcDE}	11,82 ^{cE}	0,08	*	
		45	12,12 ^{cA}	14,50 ^{aA}	12,80 ^{bBC}	11,97 ^{cB}	11,05 ^{dG}	0,06	***	
	LUS	25	11,58 ^{CB}	12,15 ^{abD}	12,23 ^{abCDE}	11,97 ^{bCE}	12,52 ^{aB}	0,12	***	
		35	11,58 ^{CB}	12,06 ^{bD}	11,95 ^{bDE}	12,57 ^{aC}	12,52 ^{aB}	0,08	***	
		45	11,58 ^{dB}	14,08 ^{aB}	12,97 ^{bB}	11,58 ^{dA}	12,47 ^{cB}	0,04	***	
	SUS	25	12,22 ^{aA}	12,34 ^{aD}	11,85 ^{bE}	12,20 ^{aD}	12,15 ^{aC}	0,06	***	
		35	12,22 ^{bA}	12,33 ^{bD}	12,47 ^{abBCD}	12,50 ^{abC}	12,97 ^{aA}	0,15	***	
		45	12,22 ^{dA}	13,47 ^{bC}	14,00 ^{aA}	11,25 ^{dA}	11,97 ^{cD}	0,09	***	
		EPM		0,07	0,07	0,10	0,16	0,06	0,04	
		Sig		***	***	***	***	***	***	
	pH	AB	25	6,76 ^{abA}	6,77 ^{aA}	6,66 ^{dC}	6,71 ^{cA}	6,74 ^{bcA}	0,01	***
			35	6,76 ^{aA}	6,75 ^{aABC}	6,69 ^{bB}	6,71 ^{bA}	6,62 ^{cD}	0,01	***
			45	6,76 ^{aA}	6,64 ^{bD}	6,26 ^{cF}	5,81 ^{dE}	5,39 ^{eH}	0,01	***
		LUS	25	6,76 ^{aA}	6,76 ^{aAB}	6,78 ^{aA}	6,69 ^{bB}	6,64 ^{cBC}	0,01	***
35			6,76 ^{aA}	6,72 ^{bBC}	6,68 ^{cB}	6,65 ^{dC}	6,63 ^{eCD}	0,00	***	
45			6,76 ^{aA}	6,65 ^{bD}	6,35 ^{cD}	5,77 ^{dF}	5,46 ^{eF}	0,01	***	
SUS		25	6,77 ^{aA}	6,77 ^{aAB}	6,68 ^{bBC}	6,69 ^{bB}	6,65 ^{cB}	0,01	***	
		35	6,77 ^{aA}	6,76 ^{aAB}	6,67 ^{cBC}	6,71 ^{bA}	6,60 ^{dE}	0,01	***	
		45	6,77 ^{aA}	6,71 ^{bC}	6,32 ^{cE}	5,88 ^{dD}	5,41 ^{eG}	0,01	***	
		EPM		0,00	0,01	0,00	0,00	0,00		
		Sig		***	***	***	***	***		

^{A-H} As letras minúsculas/maiúsculas diferentes nas linhas/colunas indicam diferença estatística dentro do mesmo experimento pelo teste de Tukey, sendo que: letras minúsculas nas linhas indicam diferenças nos dias de armazenamento em relação a mesma temperatura; e letras maiúsculas nas colunas indicam diferença no dia de armazenamento em relação as diferentes temperaturas.

AB: amostra sem ultrassom e sem probióticos; LUS: amostra com ultrassom e com probióticos; SUS: amostra sem ultrassom e com probióticos.

EPM: Erro padrão da média; Sig.: significância: *** (P<0,001); ** (P<0,01); * (P<0,05); n.s. (não significativo)

4.3.4 Insolubilidade

Os resultados de insolubilidade (Tabela 10) mostraram aumento de insolubilidade significativos ($P < 0,001$) em todos os tratamentos no decorrer dos dias de armazenamento na temperatura de 45°C a partir dos 60 dias de armazenamento.

Tabela 10 - Valores insolubilidade do leite reconstituído oriundo dos diferentes tratamentos de leite em pó estocados a 25, 35 e 45 °C durante 120 dias.

Análise	Tratamento	Temp. (°C) armaz.	DIAS DE ARMAZENAMENTO					EPM	Sig	
			1	30	60	90	120			
Insolubili dade (g)	AB	25	0,012 ^{CA}	0,014 ^{CB}	0,033 ^{AB}	0,025 ^{BC}	0,023 ^{BD}	0,001	***	
		35	0,012 ^{CA}	0,010 ^{CB}	0,061 ^{CB}	0,206 ^{BC}	1,314 ^{AC}	0,008	***	
		45	0,012 ^{CA}	0,705 ^{CA}	12,974 ^{BA}	16,484 ^{AB}	16,390 ^{AB}	0,752	***	
	LUS	25	0,015 ^{CA}	0,018 ^{CB}	0,062 ^{BB}	0,048 ^{BC}	0,103 ^{AD}	0,004	***	
		35	0,015 ^{BA}	0,016 ^{BB}	0,060 ^{BB}	0,057 ^{BC}	0,720 ^{ACD}	0,052	***	
		45	0,015 ^{DA}	0,065 ^{DB}	12,216 ^{CA}	20,903 ^{AA}	18,290 ^{BA}	0,685	***	
	SUS	25	0,013 ^{DA}	0,056 ^{BB}	0,038 ^{CB}	0,015 ^{DC}	0,063 ^{AD}	0,002	***	
		35	0,013 ^{DA}	0,028 ^{DB}	0,063 ^{CB}	0,164 ^{BC}	0,720 ^{ACD}	0,010	***	
		45	0,013 ^{CA}	0,062 ^{CB}	12,303 ^{BA}	18,217 ^{AB}	18,580 ^{AA}	0,530	***	
	EPM			0,001	0,038	0,239	0,742	0,267		
	Sig			n.s.	***	***	***	***		

^{A-D} As letras minúsculas/maiúsculas diferentes nas linhas/colunas indicam diferença estatística dentro do mesmo experimento pelo teste de Tukey, sendo que: letras minúsculas nas linhas indicam diferenças nos dias de armazenamento em relação a mesma temperatura; e letras maiúsculas nas colunas indicam diferença no dia de armazenamento em relação as diferentes temperaturas.

AB: amostra sem ultrassom e sem probióticos; LUS: amostra com ultrassom e com probióticos; SUS: amostra sem ultrassom e com probióticos.

EPM: Erro padrão da média.

Sig.: significância: *** (P<0,001); ** (P<0,01); * (P<0,05); n.s. (não significativo)

A capacidade de reidratação de produtos lácteos em pó geralmente decai durante o armazenamento (FYFE et al., 2011). Em leites em pó com alto teor de proteína o declínio da capacidade de reidratação está relacionado com o teor de caseína, uma vez que as micelas tendem a se agregar perto da superfície da partícula de pó e são liberadas em solução mais lentamente do que as proteínas de soro de leite (MIMOUNI et al., 2010).

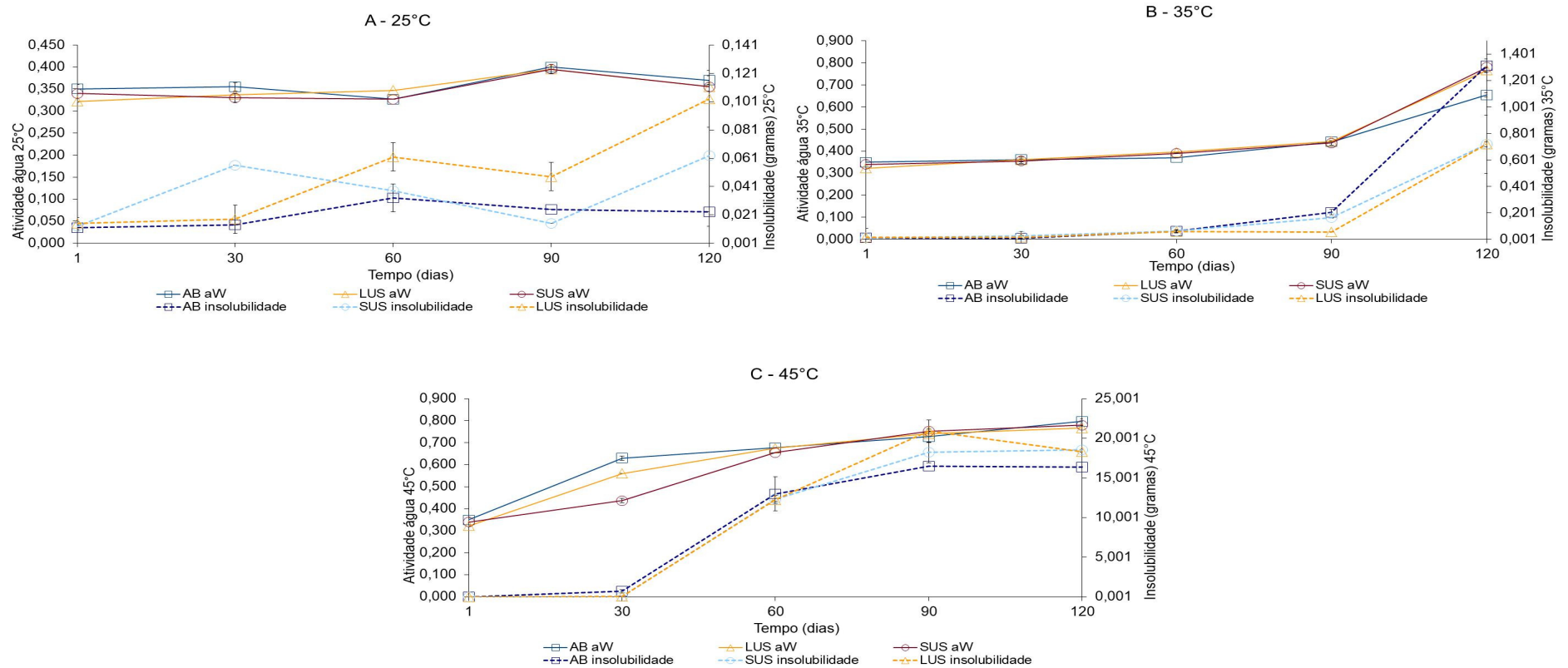
Estudo realizado em leite em pó desnatado armazenado em embalagens plásticas (polietileno) e de papel por 135 dias a 37°C e 90% de umidade relativa mostrou aumento no índice de insolubilidade. Sugerindo que a diminuição na solubilidade das proteínas que ocorreu durante o armazenamento, seria devida as alterações ocorridas na estrutura da proteína e posterior agregação. Outra causa seria os produtos de reação de *Maillard* que também poderiam causar um aumento na insolubilidade (REHMAN; FARKYE; SCHAFFNER, 2003). O que poderia ter ocorrido nos leites armazenados a 45°C pertencentes aos três tratamentos realizados, decorrente que ocorreu aumento ($P < 0,001$) nos valores de insolubilidade a partir dos 60 dias de armazenamento em diante (Tabela 10). Enquanto que nos leites armazenados a 35°C o aumento de insolubilidade ocorreu somente no 120º dia de armazenamento.

O aumento da insolubilidade está relacionado com o aumento dos valores de atividade de água, decorrente que em valores altos, conforme Perrone et al. (2013) acima de 0,2 pode ocorrer degradações das proteínas e dos açúcares presentes (Cheng, 2017). Acontecimentos esses que poderiam ter ocorrido a 45°C em todos os tratamentos realizados já a partir dos 30 dias (figura 17 C) tendo em vista valores mais elevados de atividade de água quando comparados as outras temperaturas de armazenamento. A 35°C o aumento de insolubilidade ocorreu aos 120 dias, (Figura 17 B). Na temperatura de 25°C o aumento significativo ($P < 0,001$) de insolubilidade ocorreu nos 120 dias de armazenamento (0,103; 0,063), mas somente nos tratamentos LUS e SUS (Figura 17 A).

Haque et al., (2011) realizaram estudo para testar a hipótese que as modificações conformacionais da proteína e as interações água-proteína são dois fatores principais que se acredita induzirem a instabilidade da proteína e eventualmente afetam a solubilidade do pó concentrado de proteína do leite

(MPC). A proteína concentrada de leite foi armazenada em diferentes atividades de água (0.0-0.85) e temperaturas (25 e 45 °C) por até 12 semanas, sendo as amostras examinadas periodicamente para determinar a solubilidade, a alteração na conformação da proteína por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e estado da água (interação da água com a molécula de proteína/superfície). As interações proteína/proteína podem ser iniciadas pelo desdobramento de moléculas de proteína afetando a solubilidade, sendo que o armazenamento com maior atividade de água resultou em mais moléculas de água próximas à superfície da proteína, assim como um desdobramento de proteína ligeiramente maior, o que poderia levar à perda de solubilidade, fato esse que ocorreu nas amostras com o passar do tempo de armazenamento e com aumento da atividade de água. Nas amostras armazenadas a 25, 35 e 45 °C, independente do tratamento aplicado, o aumento significativo de insolubilidade ($P < 0,001$) ocorreu a partir dos 60 dias de armazenamento. Comparando os diferentes tratamentos no mesmo período de armazenamento observa-se aumento significativo de insolubilidade na amostra controle armazenada a 45 °C já nos 30 dias de armazenamento, coincidindo também com um valor significativamente maior de a_w (Tabela 7). Os demais tratamentos armazenados a 45 °C apresentaram aumento de insolubilidade a partir dos 60 dias quando comparado com os demais tratamentos armazenados a 25 e 35 °C. Os valores aumentados de insolubilidade podem ser correlacionados com valores de a_w e umidade significativamente mais elevada ($P < 0,001$), independente do tratamento, quando armazenados a 45 °C, o que já ocorreu nos 30 dias de armazenamento.

Figura 17 - Valores de aw do leite em pó e insolubilidade (g) do leite reconstituído oriundo dos diferentes tratamentos de leite em pó estocados a 25 (A), 35 (B) e 45 °C (C) durante os períodos de 1, 30, 60, 90 e 120 dias.



Valores com médias e desvio padrão.

AB: amostra sem ultrassom e sem probióticos; LUS: amostra com ultrassom e com probióticos; SUS: amostra sem ultrassom e com probióticos; As linhas contínuas representam os valores de atividade de água e as pontilhadas, os de insolubilidade.

As amostras tratadas com US armazenadas a 45°C apresentaram valores de insolubilidade significativamente mais elevados das amostras não tratadas a partir dos 90 dias de armazenamento, resultados diferentes daqueles demonstrados por Chandrapala et al. (2014), o qual observou melhora da solubilidade dos pós de proteína concentrada de leite até os 60 dias de armazenamento a 25°C com umidades relativas de 23,1 e 75,3%. As amostras tratadas com US e armazenadas a 25 e 35°C não apresentaram diferença significativa no parâmetro insolubilidade quando comparadas com as amostras controle e sem US.

4.3.5 Composição

A composição dos leites reconstituídos pertencentes aos diferentes tratamentos e armazenados nas diferentes temperaturas, durante o período de armazenamento são apresentados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11 - Valores de gordura e lactose em leites reconstituídos oriundos dos diferentes tipos de tratamentos em que foram submetidos e estocados a 25, 35 e 45 °C durante 120 dias.

Análise	Tratamento	Temp. (°C) armazen.	DIAS DE ARMAZENAMENTO					EPM	Sig.
			1	30	60	90	120		
Gordura (%)	AB	25	2,96 ^{abA}	2,97 ^{abAB}	2,99 ^{aA}	2,94 ^{bcBC}	2,92 ^{cB}	0,01	***
		35	2,96 ^{aA}	2,95 ^{aAB}	2,93 ^{aA}	2,96 ^{aBC}	2,35 ^{bE}	0,01	***
		45	2,96 ^{aA}	2,28 ^{bD}	0,64 ^{eD}	0,95 ^{cE}	0,67 ^{dG}	0,01	***
	LUS	25	2,98 ^{aA}	2,97 ^{aAB}	3,02 ^{aA}	2,93 ^{aC}	2,97 ^{aB}	0,04	n.s.
		35	2,99 ^{bA}	3,00 ^{bA}	2,90 ^{cB}	3,05 ^{aA}	3,04 ^{aA}	0,01	***
		45	2,98 ^{aA}	2,44 ^{bC}	0,71 ^{dD}	0,96 ^{cE}	0,75 ^{dF}	0,03	***
	SUS	25	2,99 ^{aA}	2,99 ^{aA}	2,99 ^{aA}	2,97 ^{aBC}	2,81 ^{bC}	0,03	***
		35	2,99 ^{aA}	2,99 ^{aA}	2,97 ^{aA}	2,98 ^{aB}	2,66 ^{bD}	0,01	***
		45	2,99 ^{aA}	2,85 ^{bB}	1,01 ^{dC}	1,15 ^{cD}	0,81 ^{eF}	0,01	***
		EPM		0,00	0,03	0,03	0,01	0,02	
		Sig		n.s.	***	***	***	***	
	Lactose (%)	AB	25	4,45 ^{aA}	4,44 ^{aA}	4,44 ^{aA}	4,42 ^{bA}	4,44 ^{aA}	0,01
35			4,45 ^{aA}	4,40 ^{bB}	4,33 ^{cC}	4,23 ^{dE}	4,03 ^{eD}	0,01	***
45			4,45 ^{aA}	4,20 ^{bD}	3,57 ^{dF}	3,78 ^{cH}	3,18 ^{eG}	0,00	***
LUS		25	4,42 ^{aC}	4,39 ^{bB}	4,43 ^{aA}	4,33 ^{cC}	4,39 ^{bB}	0,00	***
		35	4,42 ^{aC}	4,42 ^{aAB}	4,23 ^{cD}	4,26 ^{bD}	4,09 ^{dC}	0,00	***
		45	4,42 ^{aC}	4,21 ^{bD}	3,52 ^{dG}	3,82 ^{cG}	3,44 ^{eE}	0,01	***
SUS		25	4,43 ^{aB}	4,39 ^{bB}	4,37 ^{dB}	4,38 ^{cB}	4,38 ^{cB}	0,00	***
		35	4,43 ^{aB}	4,40 ^{bB}	4,32 ^{cC}	4,23 ^{dE}	4,08 ^{eC}	0,01	***
		45	4,43 ^{aB}	4,27 ^{bC}	3,86 ^{dE}	3,94 ^{cF}	3,39 ^{eF}	0,00	***
		EPM		0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	
		Sig		***	***	***	***	***	

^{A-H} As letras minúsculas/maiúsculas diferentes nas linhas/colunas indicam diferença estatística dentro do mesmo experimento pelo teste de Tukey, sendo que: letras minúsculas nas linhas indicam diferenças nos dias de armazenamento em relação a mesma temperatura; e letras maiúsculas nas colunas indicam diferença no dia de armazenamento em relação as diferentes temperaturas.

AB: amostra sem ultrassom e sem probióticos; LUS: amostra com ultrassom e com probióticos; SUS: amostra sem ultrassom e com probióticos.

EPM: Erro padrão da média. Sig.: significância: *** (P<0,001); ** (P<0,01); * (P<0,05); n.s. (não significativo)

A baixa taxa de diluição do leite em pó gerou resultados de gordura abaixo de 3%, resultados de proteína abaixo de 2,9%, resultados de caseína abaixo de 2,3% e resultados de lactose abaixo de 4,3% no leite reconstituído analisado, valores esses que caracterizam leite fluido integral. A composição do produto em pó em relação ao teor de gordura foi testada e se apresentou dentro dos parâmetros de legislação (mínimo 26%), comprovando que houve padronização do leite fluido antes do processo de secagem.

Até os 60 dias de armazenamento os valores de gordura dos diferentes tratamentos nas temperaturas de 25 e 35°C não se diferem estatisticamente. O tratamento com US e com probióticos armazenado a 25°C não apresentou valores menores de gordura com diferença significativa durante os 120 dias de armazenamento, fato esse que não ocorreu nos tratamentos sem US e com probióticos e na amostra controle sem US e sem probióticos. Já a 35°C em todos os dias analisados apresentou significativamente ($P < 0,001$) os maiores valores, fato esse que poderia ser explicado pelo efeito do US em relação a homogeneização das partículas de gordura. Nos 90 e 120 dias, com exceção do tratamento com US e probióticos, os valores de gordura apresentaram resultados significativamente menores ($P < 0,001$) de gordura. Para todos os tratamentos armazenados a 45°C os resultados de gordura foram significativamente menores ($P < 0,001$) quando comparados aos demais tempos de armazenamento devido à dificuldade de diluição desse produto (elevados valores de insolubilidade).

Quando comparados os diferentes tratamentos nas diferentes temperaturas de armazenamento observou-se resultados significativamente ($P < 0,001$) maiores de gordura nos tratamentos com US e com probióticos armazenados a 35°C (3,00%) e no tratamento sem US e com probióticos armazenados a 25 e 35°C (2,99%) nos 30 dias de armazenamento. Aos 90 e 120 dias de armazenamento as amostras tratadas com US e com probióticos armazenadas a 35°C apresentaram resultados de gordura (3,05 e 3,04%) significativamente maiores ($P < 0,001$) quando comparados com os diferentes tratamentos nas diferentes temperaturas de armazenamento, o que poderia ser justificado pelo efeito do US na melhor homogeneização das partículas de gordura mesmo no decorrer do tempo de armazenamento. Valores maiores de gordura são resultados de melhor diluição/homogeneização do leite em pó na água, tendo em vista que todo leite em

pó estava com seu teor de gordura dentro dos valores de legislação, ou seja, deveria apresentar no momento da reconstituição no mínimo 3% de gordura.

O teor de lactose no tratamento sem US e com probióticos teve valores significativamente maiores ($P < 0,001$) no momento da fabricação (4,43), quando comparado ao tratamento com US e com probióticos (4,42). A amostra controle (sem tratamento com US e sem probióticos) armazenada a 25°C somente no tempo de armazenamento 90 apresentou resultado significativamente ($P < 0,01$) menor de lactose (4,42), mantendo-se sem diferença significativa nos outros tempos de armazenamento, diferente dos outros tratamentos que apresentaram diminuição nos teores do açúcar em mais pontos no decorrer do período de armazenamento. Amostras armazenadas a 35 e 45°C para todos os tratamentos apresentaram resultados semelhantes de diminuição dos teores de lactose no decorrer do período de armazenamento, podendo ser efeito da degradação da lactose pelas bactérias lácticas ou então pela reação de *Maillard* nessas amostras, sendo que a 45°C esse efeito pôde ser mais claramente visualizado.

Tabela 12 - Valores de proteína e caseína do leite reconstituído oriundo dos diferentes tratamentos de leite em pó estocados a 25, 35 e 45°C durante 120 dias.

Análise	Tratamento	Temp. (°C) armazen.	DIAS DE ARMAZENAMENTO					EPM	Sig.	
			1	30	60	90	120			
Proteína (%)	AB	25	3,12 ^{aA}	3,11 ^{aAB}	3,00 ^{bA}	3,00 ^{bA}	2,97 ^{cC}	0,01	***	
		35	3,12 ^{bA}	3,09 ^{cBC}	2,92 ^{dAB}	2,90 ^{dC}	3,15 ^{aA}	0,01	***	
		45	3,12 ^{aA}	3,05 ^{bC}	0,68 ^{cD}	0,61 ^{dE}	0,32 ^{eH}	0,01	***	
	LUS	25	3,09 ^{aA}	3,09 ^{aBC}	3,01 ^{bA}	2,92 ^{cC}	2,85 ^{dD}	0,01	***	
		35	3,09 ^{aA}	3,10 ^{aBC}	2,83 ^{cB}	2,92 ^{bC}	2,43 ^{dF}	0,02	***	
		45	3,09 ^{aA}	3,16 ^{aA}	1,03 ^{bC}	0,44 ^{cF}	0,49 ^{cG}	0,04	***	
	SUS	25	3,11 ^{aA}	3,09 ^{aBC}	2,93 ^{cAB}	2,97 ^{bB}	2,83 ^{dE}	0,01	***	
		35	3,11 ^{aA}	3,11 ^{aAB}	2,89 ^{cAB}	2,87 ^{cD}	2,99 ^{bB}	0,01	***	
		45	3,11 ^{aA}	3,09 ^{aBC}	1,00 ^{bC}	0,59 ^{cE}	0,49 ^{dG}	0,01	***	
	EPM			0,00	0,01	0,03	0,01	0,00		
	Sig			n.s.	***	***	***	***		
	Caseína (%)	AB	25	2,35 ^{aA}	2,31 ^{bA}	2,36 ^{aA}	2,34 ^{aA}	2,33 ^{cA}	0,01	***
			35	2,35 ^{aA}	2,29 ^{bAB}	2,26 ^{bcB}	2,24 ^{dD}	2,30 ^{abAB}	0,01	***
			45	2,35 ^{aA}	2,12 ^{bD}	0,64 ^{cD}	0,60 ^{dF}	0,44 ^{eF}	0,00	***
		LUS	25	2,34 ^{aB}	2,29 ^{bB}	2,35 ^{aA}	2,29 ^{bC}	2,17 ^{cD}	0,00	***
35			2,34 ^{aB}	2,30 ^{abAB}	2,26 ^{bB}	2,25 ^{bD}	2,26 ^{bBC}	0,01	***	
45			2,34 ^{aB}	2,19 ^{bC}	0,87 ^{cC}	0,52 ^{dH}	0,51 ^{dE}	0,02	***	
SUS		25	2,36 ^{aA}	2,30 ^{cAB}	2,30 ^{cab}	2,32 ^{bB}	2,16 ^{dD}	0,00	***	
		35	2,36 ^{aA}	2,29 ^{bAB}	2,26 ^{cB}	2,21 ^{dE}	2,25 ^{cC}	0,00	***	
		45	2,36 ^{aA}	2,21 ^{bC}	0,85 ^{cC}	0,56 ^{dG}	0,53 ^{dE}	0,01	***	
EPM			0,001	0,007	0,023	0,004	0,01			
Sig			***	***	***	***	***			

^{A-H} As letras minúsculas/maiúsculas diferentes nas linhas/colunas indicam diferença estatística dentro do mesmo experimento pelo teste de Tukey, sendo que: letras minúsculas nas linhas indicam diferenças nos dias de armazenamento em relação a mesma temperatura; e letras maiúsculas nas colunas indicam diferença no dia de armazenamento em relação as diferentes temperaturas.

AB: amostra sem ultrassom e sem probióticos; LUS: amostra com ultrassom e com probióticos; SUS: amostra sem ultrassom e com probióticos.

EPM: Erro padrão da média.

Sig.: significância: *** (P<0,001); ** (P<0,01); * (P<0,05); n.s. (não significativo)

A insolubilidade da proteína e principalmente da caseína, além dos valores de insolubilidade apresentados na tabela 10, também pode ser confirmada pelos resultados apresentados na tabela 11, onde para todos os tratamentos estocados a 35 e 45°C, a partir de 60 dias de armazenamento, apresentaram valores significativamente reduzidos quando comparados ao tempo 1 e 30 de armazenamento, demonstrando aumento de insolubilidade dessas amostras de leite em pó, fato esse já relacionado com os valores mais elevados de aw. Aos 90 e 120 dias de armazenamento todos os tratamentos armazenados a 45°C continuaram com teores de proteína e caseína reduzidos significativamente.

Amostras tratadas com US armazenadas a 25°C apresentaram resultados de insolubilidade mais elevados quando comparados com os resultados das amostras controle e sem US (Figura 17A), o que pode ser resultado do rearranjo de proteínas promovido pelo processo de *spray dryer* e o emprego do US, já que nessa temperatura ocorreu pequenas alterações de atividade de água, diferente do que ocorreu nas temperaturas de 35 e 45°C. A 35°C a maior insolubilidade ocorreu no tratamento do leite que não recebeu US e nem probiótico (Figura 17B) a partir dos 90 dias de armazenamento.

Os resultados de caseína tiveram o mesmo comportamento dos valores de proteína em relação à diminuição no decorrer do tempo de estocagem, o que pode estar ligado a agregação das micelas de caseína perto da superfície da partícula de pó durante a estocagem que são liberadas em solução mais lentamente do que as proteínas de soro de leite conforme escrito por Mimouni et al. (2010), resultando também valores mais elevados de insolúveis. Como nas reações de *Maillard* no leite reagem caseína, lactoalbumina, lactoglobulina e o açúcar lactose, a diminuição nos teores desses componentes no leite pode ser resultado dessa reação, bastante expressiva em temperatura de armazenagem de 45°C, comprovada também pelos resultados de luminosidade (Tabela 8). Os valores de lactose de todos os tratamentos aplicados armazenados a 45°C, já nos 30 dias de armazenamento, apresentaram diferença significativa em relação às temperaturas de 25 e 35°C, sendo essa diferença mais impactante com o passar do tempo de estocagem.

As amostras tratadas com US, já no dia da fabricação apresentaram valores significativamente menores de proteína, caseína e lactose quando

comparados com as amostras que não tiveram tratamento de US, o que pode ser resultado do cisalhamento desses compostos no momento do tratamento com US.

4.3.6 Eficiência de encapsulação da cultura probiótica

A viabilidade do emprego do processo *spray dryer* como agente encapsulante do probiótico *Lactobacillus rhamnosus*, para ser aplicado em leite em pó integral, foi avaliada juntamente com a eficiência do método empregado (Tabela 13).

Tabela 13 – Viabilidade do método *spray dryer* como agente encapsulante e eficiência da encapsulação de *Lactobacillus rhamnosus* em leite concentrado e leite reconstituído sob diferentes tratamentos.

TRATAMENTO	LUS	SUS	EPM	Sig.
Viabilidade das colônias do probiótico no leite concentrado (log UFC/mL)	5,35 ^a	5,21 ^b	0,027	***
Viabilidade das colônias do probiótico no leite reconstituído (log UFC/mL)	4,03 ^b	4,12 ^a	0,011	***
Eficiência de encapsulação (EE%)	75	79	—	—

^{a-b}As letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey entre os tratamentos.

LUS: amostra com ultrassom e com probióticos; SUS: amostra sem ultrassom e com probióticos.

EPM: Erro padrão da média.

Sig.: significância: *** (P<0,001); ** (P<0,01); * (P<0,05); n.s. (não significativo).

O leite concentrado antes de ser adicionada a cultura de probiótico apresentou número de colônias de bactérias lácticas de 3,19 log UFC/mL. Relacionando esse número de colônias no tratamento AB com o número de colônias de bactérias presente no leite que foi adicionado de probióticos e tratado com o US (5,35 log UFC/mL), obtemos como informação que o número

de colônias de *Lactobacillus rhamnosus* que o processo *spray dryer* incorporou nesse leite foi de 2,16 log. Em relação ao leite não tratado com o US e adicionado do probióticos (SUS, 4,02 log UFC/mL), a incorporação foi de 2,02 log de probióticos. Diferente de outros trabalhos realizados com a adição de probióticos como de Hernández e Jaramillo (2004), a contagem de bactérias lácticas ficou abaixo do estipulado pela legislação brasileira para o produto ter apelo de probiótico. Hernández e Jaramillo (2004) avaliaram o comportamento de leites fermentados com cultivo de iogurte e *Lactobacillus acidophilus* e cultivo de iogurte com *Bifidobacterium* spp. Para leite fermentado com *Bifidobacterium* utilizaram as relações de cultivo de iogurte: Bifido de 1:7, 1:8 e 1:9 e para leite fermentado com *Lactobacillus* as relações de 1:5, 1:7 e 1:9. O trabalho verificou que os leites fermentados podem ser preparados na relação 1:7 e 1:5 respectivamente com uma viabilidade na ordem de 10^9 UFC/mL, considerado valor terapêutico mínimo, o qual permaneceu por 15 dias no leite com *Bifidobacterium* e 21 dias no leite com *Lactobacillus*. Fato que não ocorreu nesse trabalho, pois o número de probiótico variou de 2,02 a 2,16 não alcançando valor terapêutico recomendado.

A eficiência de encapsulação no leite pertencente ao tratamento LUS foi de 75% e no tratamento com o leite SUS foi de 79% (Tabela 13). Estudo realizado por Maciel et al., (2014), o qual testou a eficiência de encapsulação de probióticos com leite desnatado obteve resultado semelhante a esse de aproximadamente 80% com *Lactobacillus acidophilus*, comprovando também sua viabilidade quando estocado a temperatura ambiente e sua viabilidade quando submetido a condições simulando a passagem pelo trato gastrointestinal.

4.3.7 Bactérias lácticas

Durante o decorrer do tempo de armazenagem as contagens de bactérias lácticas foram reduzindo em todos os tratamentos indiferente da temperatura de estocagem. No tratamento com US e com probióticos a contagem foi significativamente mais elevada ($P < 0,001$) nos tempos 30 e 60 dias (3,47; 3,00; 1,48; 3,39; 2,79; 0,57) de armazenagem quando comparado

com as amostras sem US e com probióticos, mesmo partindo de uma contagem mais baixa (4,02) no dia da fabricação. Nguyen, Lee e Zhou (2009) testaram o efeito do ultrassom a 20 kHz nas atividades fermentativas de quatro diferentes *Bifidobacterium* em leite, comprovando que o ultrassom reduziu o tempo de fermentação para três das quatro bactérias testadas. O ultrassom favoreceu o rompimento das células das bactérias probióticas, e isso promoveu liberação da enzima intracelular b-galactosidase, a qual promoveu a hidrólise da lactose e trans-galactosilação, aumentando conseqüentemente o crescimento das células bacterianas remanescentes no leite inoculado durante a fermentação. Fato esse pode ter ocorrido quando aplicado ultrassom nas amostras de leite concentrado, agindo nas bactérias lácticas naturais do leite antes da adição de probióticos, o que posteriormente favoreceu o seu crescimento e desenvolvimento durante o período de armazenamento.

Nos períodos de 90 e 120 dias de armazenagem as contagens das amostras tratadas com US e não tratadas com US e dosadas de probióticos foram estatisticamente menores ($P < 0,001$) do tratamento sem US e sem probióticos (AB) (Tabela 14).

Tabela 14 – Número de colônias de bactérias lácticas (log UFC/mL) em leite reconstituído oriundo de leites em pó submetido a diferentes tratamentos armazenados durante 120 dias a 25, 35 e 45 °C.

Análise	Tratamento	Temp. (°C) armaz.	DIAS DE ARMAZENAMENTO					EPM	Sig	
			1	30	60	90	120			
Bactérias lácticas (UFC/mL)	AB	25	3,35 ^{aB}	3,28 ^{aAB}	3,25 ^{aAB}	2,83 ^{bA}	2,70 ^{bA}	0,06	***	
		35	3,35 ^{aB}	3,06 ^{aBC}	3,14 ^{aB}	1,89 ^{bC}	0,50 ^{cD}	0,23	***	
		45	3,35 ^{aB}	1,56 ^{bE}	1,20 ^{cE}	<10 (est.)	<10 (est.)	0,02	***	
	LUS	25	4,02 ^{aA}	3,47 ^{bA}	3,39 ^{bA}	2,3 ^{cB}	2,16 ^{dAB}	0,03	***	
		35	4,02 ^{aA}	3,00 ^{bC}	2,79 ^{bC}	1,52 ^{cD}	1,19 ^{dC}	0,08	***	
		45	4,02 ^{aA}	1,48 ^{bF}	0,57 ^{cF}	<10(est.)	<10 (est.)	0,04	***	
	SUS	25	4,11 ^{aA}	3,31 ^{bA}	3,07 ^{bB}	2,08 ^{cBC}	1,92 ^{cB}	0,07	***	
		35	4,11 ^{aA}	2,39 ^{bD}	1,62 ^{cD}	1,15 ^{dE}	1,22 ^{cdC}	0,13	***	
		45	4,11 ^{aA}	1,27 ^{bF}	<10 (est.)	<10 (est.)	<10 (est.)	0,06	***	
	EPM			0,02	0,02	0,06	0,06	0,09	0,18	
	Sig			***	***	***	***	***	***	

^{A-D} As letras minúsculas/maiúsculas diferentes nas linhas/colunas indicam diferença estatística dentro do mesmo experimento pelo teste de Tukey, sendo que: letras minúsculas nas linhas indicam diferenças nos dias de armazenamento em relação a mesma temperatura; e letras maiúsculas nas colunas indicam diferença no dia de armazenamento em relação as diferentes temperaturas.

AB: amostra sem ultrassom e sem probióticos; LUS: amostra com ultrassom e com probióticos; SUS: amostra sem ultrassom e com probióticos.

EPM: Erro padrão da média.

Sig.: significância: *** (P<0,001); ** (P<0,01); * (P<0,05); n.s. (não significativo)

Para a temperatura de estocagem a 45°C a redução da contagem de bactérias foi bastante impactante no decorrer do tempo de armazenagem, chegando <10 UFC/mL estimado. Amostra tratada com US e adicionada de probióticos armazenada a 45°C no período de armazenamento de 60 dias apresentava crescimento bacteriano (0,57), diferente da amostra sem tratamento com US adicionada de probióticos, a qual já não apresentava crescimento bacteriano (<10 est.). Nesse mesmo período o teor de lactose da amostra tratada com ultrassom e com probióticos era estatisticamente menor ($P < 0,001$) quando comparado com a amostra sem ultrassom e com probióticos, fato esse que pode estar ligado com a quebra das moléculas da lactose e consequente favorecimento do crescimento das bactérias lácticas.

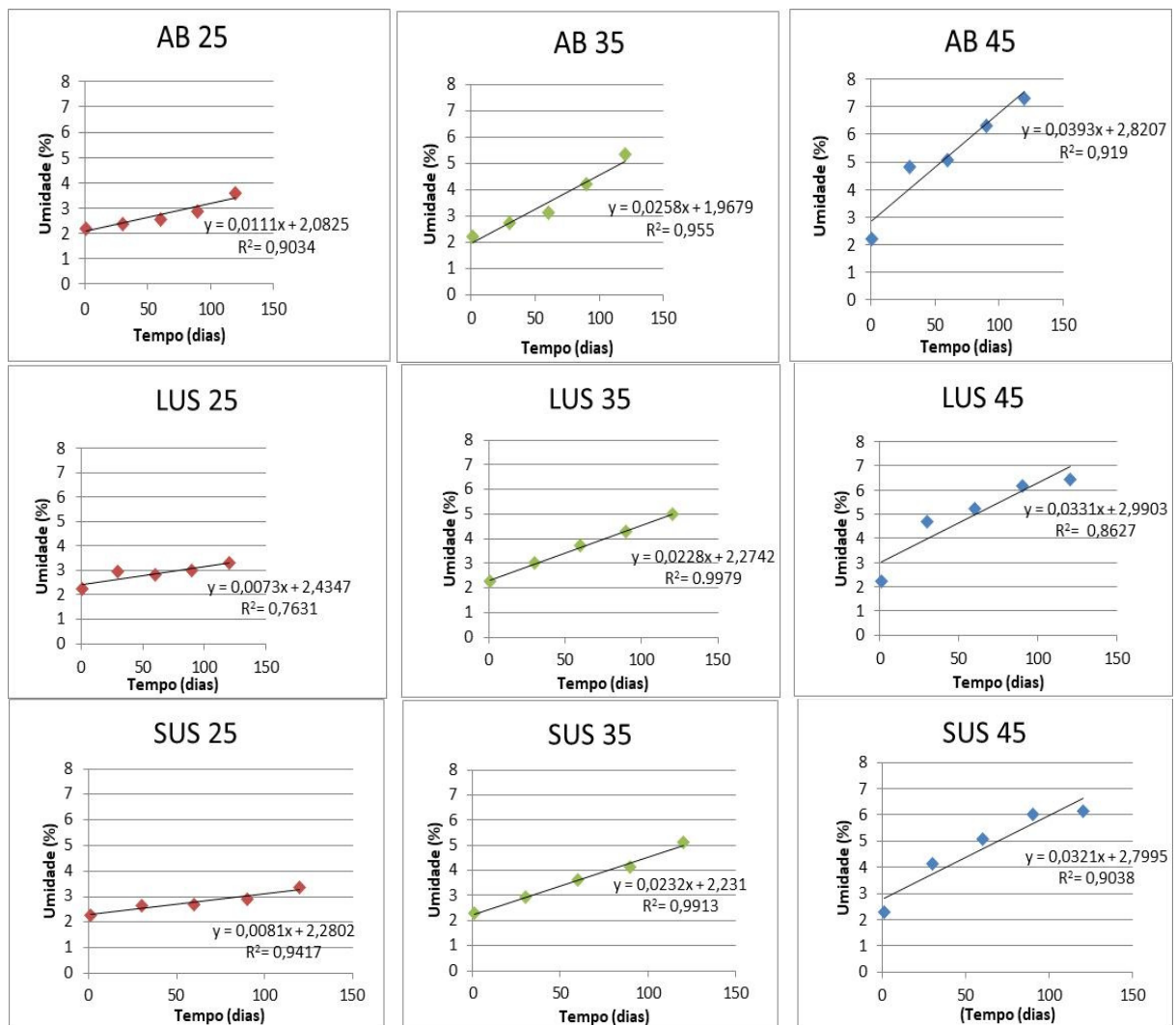
Os benefícios do US no crescimento de bactérias lácticas foram comprovados também por Barukcic et al., (2015), os quais investigaram a influência do US de alta intensidade no processo de fermentação de soro de leite em relação á ativação da cultura de iogurte ou *Lactobacillus acidophilus* La-5. Os tratamentos com US na potência de 84 W por 150 segundos aplicados antes da inoculação das culturas lácteas testadas resultaram em tempo de fermentação 30 minutos menor com a cultura La-5 em comparação com a amostra controle. Além disso, independentemente da cultura utilizada, o US a 480 W, a temperatura de 55°C por 8 minutos, utilizado no lugar da pasteurização, resultou em soro de leite fermentado com um aumento de até 2 ciclos no número de células viáveis no final da fermentação.

4.3.8 Vida de prateleira acelerada

Os resultados experimentais para determinação da vida útil dos diferentes tipos de leites foi fundamentado no atributo umidade, cuja legislação brasileira estabelece valor máximo de 3,5% (BRASIL, 1996). Esses resultados durante o armazenamento dos diferentes tipos de leites nas temperaturas de 25°C, 35°C e 45°C, são mostrados na figura 18. Com base no observado todas as reações se ajustaram ao modelo cinético de ordem zero, pois ao plotar um gráfico, em escala linear, do atributo umidade versus o tempo, os dados se ajustaram a uma reta gerando um bom coeficiente de determinação (R^2) para o modelo ajustado, sendo

esse tipo de comportamento comum em alimentos segundo Teixeira Neto et al., (2004).

Figura 18 – Modelo cinético da alteração de umidade em leite em pó integral obtido de diferentes tratamentos (AB, LUS e SUS) armazenados a 25°C, 35°C e 45°C em 76% UR durante o período de 120 dias.



Nota: AB: amostra sem ultrassom e sem probióticos; LUS: amostra com ultrassom e com probióticos; SUS: amostra sem ultrassom e com probióticos.

Verificou-se um bom ajuste do modelo de reação de ordem zero, sendo que o valor de R^2 variou de 0,76 a 0,99. Observou-se que na temperatura de 45 °C ocorreu aumento de umidade nos três tipos de leites em pó pertencentes aos três tratamentos, atingindo o valor limite de 3,5% estipulado pela legislação (BRASIL, 1996). Através da equação de regressão, foram determinados os tempos de vida útil para essa temperatura de armazenamento para cada tratamento que foram 17, 15 e 21 dias de armazenamento para os tratamentos AB, LUS e SUS respectivamente (Figura 18). Calculou-se também os dias de vida de prateleira para cada leite em pó nas temperaturas de 25 °C e 35 °C, os quais podem ser visualizados na tabela 15.

Tabela 15 – Estimativa de tempo de vida de prateleira de leites em pó obtidos de diferentes tratamentos estocados a 25 °C e 35 °C em 76% UR.

TRATAMENTO	Estimativa da vida de prateleira (dias)	
	25 °C	35 °C
AB	127	55
LUS	145	53
SUS	150	54

Nota: AB: amostra sem ultrassom e sem probióticos; LUS: amostra com ultrassom e com probióticos; SUS: amostra sem ultrassom e com probióticos.

Conforme aumentou a temperatura de armazenamento, mais rapidamente os leites em pó absorveram umidade, sendo que os leites em pó armazenados a 25 °C apresentaram valores de tempo de vida de prateleira entre 127 a 150 dias, enquanto que a 35 °C entre 53 a 55 dias (Tabela 15).

Os valores da energia de ativação (E_a) para o atributo umidade são apresentados da tabela 16.

Tabela 16 – Energia de ativação nos diferentes tipos de leites em pó elaborados.

TRATAMENTO	Energia de ativação (Ea) J/mol
AB	0,113
LUS	0,077
SUS	0,069

Nota: AB: amostra sem ultrassom e sem probióticos; LUS: amostra com ultrassom e com probióticos; SUS: amostra sem ultrassom e com probióticos.

Na embalagem empregada nesse trabalho, as amostras de leite em pó sem US e com probióticos (SUS) apresentaram valores de energia de ativação (Ea) menor, quando comparada as amostras dos leites com US e com probióticos (LUS) e sem US e sem probióticos (AB), indicando menor favorecimento na absorção de umidade. Fato que ficou bem caracterizado a 25°C e a 45°C, onde o tratamento AB apresentou o menor tempo de prateleira dos demais tratamentos (Tabela 15).

5. CONCLUSÃO

A utilização de US no modo de operação normal promoveu alterações significativas nos parâmetros de acidez, viscosidade e pH em leite concentrado, enquanto que no modo de operação *sweep* as alterações significativas se deram nos parâmetros de viscosidade, insolubilidade e luminosidade.

O emprego do US no modo de operação normal, no leite concentrado que foi transformado em leite em pó favoreceu na homogeneização da gordura quando reconstituído. A 35°C no tempo 1, 30, 90 e 120 dias o tratamento com ultrassom e com probióticos apresentou significativamente ($P < 0,001$) os maiores valores de gordura.

O crescimento de bactérias lácticas foi favorecido com o uso de US, no entanto seria importante novos estudos em produto com uma contagem de bactérias lácticas mais elevada na faixa de 10^8 - 10^9 UFC/mL.

As amostras tratadas com US e com probióticos apresentaram desde os 30 dias de estocagem número de colônias de bactérias lácticas estatisticamente superiores ($P < 0,001$) das amostras não tratadas com US e com probióticos.

Amostras tratadas e não tratadas com US e com probióticos mantidas a 25°C apresentaram aumento nos valores de luminosidade a partir dos 60 dias de armazenamento. A 35°C as amostras tratadas com US e com probióticos não apresentaram diferenças significativas no decorrer do tempo de armazenamento, ou seja, mantiveram a coloração branca característica do produto em pó.

Na temperatura de armazenamento de 45°C os leites pertencentes a todos os tratamentos apresentaram aumento nos valores de atividade de água e insolubilidade e diminuição dos valores de luminosidade e pH.

Em relação ao teor de proteína e caseína, todos os tratamentos estocados a 35 e 45°C, a partir de 60 dias de armazenamento, apresentaram valores reduzidos significativamente ($P < 0,001$), demonstrando aumento de insolubilidade dessas amostras de leite em pó.

Os testes de vida de prateleira acelerada demonstraram que para a embalagem de 75 micras de espessura composta de camada de polietileno de baixa densidade, camada de adesivo e camada de poliéster metalizado (camada externa) com TPVA (taxa de permeabilidade ao vapor d'água) de 0,87 gramas/m²/dia a 38°C em 90% de umidade relativa e TPO₂ (taxa de permeabilidade ao oxigênio) de 2,36

cm³/m²/dia a 23°C e 0% de umidade relativa, a melhor temperatura de armazenamento foi a 25 °C, pois o tempo foi de 127, 147 e 150 dias para os tratamentos AB, LUS e SUS respectivamente, não sendo recomendadas as temperaturas de 35°C e 45°C de armazenamento.

Tendo em vista os resultados obtidos nesse trabalho, sugere-se realização de novas pesquisas levando em consideração ampliação no uso de US em relação a tempos, temperaturas, amplitudes e frequência e sua repercussão no parâmetro umidade do leite em pó. Além disso, se faz importante um novo estudo com adição de maior quantidade de probióticos no leite a ser concentrado, com a finalidade de se obter o valor recomendado como terapêutico em leite reconstituído.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, J.M; VALLE, J. M. D.; KAREL, M. (1995). Caking phenomena in amorphous food powders. **Trends in Food Science e Technology**, v. 6, n. 5, p. 149–155. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89023-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89023-8)
- ALVES, R. M. V.; JAIME, S. B. M. (2008). Influência das propriedades de barreira de embalagens flexíveis na estabilidade de leite em pó integral. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 1, p. 46-53.
- ALVES, L. L.; CICHOSKI, A. J.; BARIN, J. S.; RAMPELOTTO, C.; DURANTE, E. C. (2013). O ultrassom no amaciamento de carnes. **Ciência Rural**, v. 43, n. 8, p. 1522 – 1528. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013000800029>
- ANALÍTICA. **Perguntas frequentes sobre banhos ultrassônicos**, 2015. Disponível em https://www.analiticaweb.com.br/informe/banhos-elma-03-2015/elma_aplicacoes_faq.pdf Acesso em: 17 de março de 2018.
- AUGUSTIN, M. A.; SANGUANRSI, P.; WILLIAMS, R.; ANDREWS, H. (2012). High shear treatment of concentrate sand drying conditions influence the solubility of milk protein concentrate powders. **Journal of Dairy Research**, v. 79, n. 4, p. 459–468. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0022029912000489>
- BARTHOLOMAI, A. **Fábricas de alimentos: procesos, equipamiento, costos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. 310 p.
- BARUKČIĆ, I.; LISAK, K. JAKOPOVIĆ, Z.; HERCEG, Z.; KARLOVIĆ, S.; BOŽANIĆ, R. (2015). Influence of high intensity ultrasound on microbial reduction, physico-chemical characteristics and fermentation of sweet whey. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 94-101.
- BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; CORRADINI, M. G.; RAYMOND, M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. (2009). Modeling the inactivation of *Listeria innocua* in raw whole milk treated under thermo-sonication. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 172-178. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.11.005>
- BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; MAWSON, R.; VEERSTEG, K.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. (2009). Composition properties, physicochemical characteristics and shelf life of whole milk after thermal and thermo-sonication treatments. **Journal of Food Quality**, v. 32, n. 3, p. 283-302. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2009.00250.x>
- BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; MAWSON, R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. (2008). Microstructure of fat globules in whole milk after thermosonication treatment. **Journal of food science**, v. 73, n. 7, p. 325-332.
- BORGOGNA, M.; BELLICH, B.; ZORZIN, L.; LAPASIN, R.; CESARO, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal

characterisation of non-conventional gelling system. **Food Chemistry**, v.122, n. 3, p.416-423. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.043>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Diretoria colegiada ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde**. Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento (MAPA). **Portaria n° 146**, de 07 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de Identidade e Qualidade de produtos lácteos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento – MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Portaria n° 369**, de 04 de setembro de 1997. Aprova a Inclusão de Coadjuvante de Tecnologia/Elaboração no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Leite em Pó. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 1997.

CAMERON, M.; MCMASTER, L. D.; BRITZ, T. (2009). Impact of ultrasound on dairy spoilage microbe and milk components. **Dairy Science Technology**, v. 89, n. 1, p. 83-98.

CARVALHO, G.R. **Influência de aplicação de ultrassom em desidratação osmótica de carne bovina**. 2014. 58 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Pardo, 2014.

CHANDRAPALA, J.; MARTIN, G. J.; ZISU, B.; KENTISH, S. E.; ASHOKKUMAR, M. (2012). The effect of ultrasound on casein micelle integrity. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 6882-6890. DOI: <http://www.doi.org/10.3168/jds.2012-5318>

CHANDRAPALA, J.; ZISU, B.; PALMER, M.; KENTISH, S. E.; ASHOKKUMAR, M. (2014). Sonication of milk protein solutions prior to spray drying and the subsequent effects on powders during storage. **Journal of Food Engineering**, v.141, p.122-127. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.05.017>

CHENG, H.; ZHU, R.; ERICHSEN, H.; SOERENSEN, J.; PETERSEN, M. A.; SKIBSTED, L. H. (2017). High temperature storage of infant formula milk powder for prediction of storage stability at ambient conditions. **International Dairy Journal**, v. 73, p.166 – 174. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.05.007>

COOK, M.T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v.162, p.56-67. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.003>

CORREIA, M. I. T. D.; LIBOREDO, J. C.; CONSOLI, M. L. D. (2012). The role of probiotics in gastrointestinal surgery. **Nutrition**, v. 28, p. 230–234.

ESHARI, H.; TONG, P.S.; CORREDIG, M. (2014). Changes in the physical properties, solubility, and heat stability of milk protein concentrates prepared from partially acidified milk. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 12, p. 7394–7401. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8609>

FOX, P. F.; BRODKORB, A. (2008). The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 677- 684. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.002>

FYFE, K.; KRAVCHUK, O.; LE, T.; DEETH, H. C.; NGUYEN, A. V.; BHANDARI, B. (2011). Storage induced changes to high protein powders: influence on surface properties and solubility. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 14, p. 2566–2575. DOI: <http://www.doi.org/10.1002/jsfa.4461>

GABRIELE, D.; MIGLIORI, M.; DI SANZO, R.; ROSSI, C. O.; RUFFOLO, S. A.; CINDIO, B. (2009). Characterisation of dairy emulsions by NMR and rheological techniques. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n.3, p.619–628. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.05.002>

GOLDIN, B.; GORBACH, S. L.; SAXELIN, M.; BARAKAT, S.; GUALTIERI, L. SALMINEN, S. (1992). Survival of *Lactobacillus species* (Strain GG) in human gastrointestinal tract. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 37, n. 1, p. 121-128.

GONZALES, A. S.; NARANJO, G. B.; LEIVA, G. E.; MALEC, L. S. (2010). Maillard reaction kinetics in milk powder: Effect of water activity at mild temperatures. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 40–45. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.07.007>

HAQUE, E. ; BHANDARI B. R. ; GIDLEY, M. J. ; DEETH, H. C. ; WHITTAKER, A. K. (2011). Ageing-induced solubility loss in milk protein concentrate powder: effect of protein conformational modifications and interactions with water. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 14, p. 2576/2581

HERNANDEZ, A. ; JARAMILLO, P. (2004). Comportamiento de los indicadores físico-químicos en leche fermentada y viabilidad de los microorganismos probióticos. **Ciência y Tecnología de Alimentos**, v. 14, n. 2.

HUBÁLEK, Z. (2003). Protectants used in the cryo preservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, n. 3, p. 205–229. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4)

JAMBRAK, A. R.; MASON, T.; LELAS, V.; KREŠIĆ, G. (2010). Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of α -lactalbumin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 254-262. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.001>

JOUPPIA, K.; ROOS, Y.H. (1994). Water Sorption and Time-Dependent Phenomena of Milk Powder. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 1798-1808.

LIU, Z. **Effects of pulsed electric field processing and ultrasound processing on the physicochemical and functional properties of proteins in milk.** 2012. 218 f. Tese (Doutorado em Filosofia – School of Applied Sciences) – RMIT University, Melbourne, 2012.

MACIEL, G. M.; CHAVES, K. S.; GROSSO, C. R.; GIGANTE, M. L. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 1991-1998.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, n. 1., p. 465-470. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.010>

MAGALHÃES, C. M.; SANTOS, M. V. Fatores que alteram a estabilidade do leite. **Ciência do Leite**, Belo Horizonte, 2017. Disponível em: <<https://cienciadoleite.com.br/noticia/3821/fatores-que-alteram-a-estabilidade-do-leite>> Acesso em: 10 ago. 2018.

MANUAL MILKOSCAN: Milko Scan™ FT1 Software Manual Revisão 6

MARTIN, M. J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M. A.; MORALES, M. E. (2013). Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 480-486. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.03.019>

MASON, T.J.; COBLEY, A. J.; GRAVES, J. E.; MORGAN, D. (2011) New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasounds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 1, p. 226-230. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.05.008>

MASON, T.J.; PANIWNKY, J.P.; LORIMER, J.P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 3, n. 3, p. S253-S260. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(96\)00034-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(96)00034-X)

MENEZES, C.R.; DURRANT, L.R. (2008). Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, v.38, n. 2, p.587-592. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000200050>

MENEZES, C. R.; BARIN, J. S.; CICHOSKI, A. J.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. (2012). Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 43, n. 7, p. 1309-1316. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013005000084>

MIL, P. J. J. van; JANS, J. A. **Storage stability of whole milk powder: effects of process and storage conditions on product properties.** Netherlands: NIZO, 1991.

MIMOUNI, A.; DEETH, H. C.; WHITTAKER, A. K.; GIDLEY, M. J.; BHANDARI, B. R. (2010). Investigation of the micro-structure of milk protein concentrate powders

during rehydration: alterations during storage. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 463–472. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2369>

MIMOUNI, A., DEETH, H., WHITTAKER, A.K., GIDLEY, M.J., BHANDARI, B.R. (2010). Rehydration of high-protein-containing dairy powder: slow- and fast dissolving components and storage effects. **Dairy Science and Technology**, v. 90, n. 2-3, p. 335-344. DOI: <https://doi.org/10.1051/dst/2010002>

MOHAMMADI, V.; GHASEMI-VARNAMKHASTI, M. EBRAHIMI, R.; ABBASVALI, M. (2014). Ultrasonic techniques for the milk production industry. **Measurement**, v. 58, p. 93-102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2014.08.022>

MOURA, S. C. S. R.; BERBARI, S. A.; GERMER, S. P. M.; ALMEIDA, M. E. M.; FEFIM, D. A. (2007). Determinação da vida-de-prateleira de maçã-passa por testes acelerados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p. 141-148. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000100025>

NGUYEN, T. M. P. ;LEE, Y. K.; ZHOU, W. (2012). Effect of high intensity ultrasound on carbohydrate metabolism of bifidobacteria in milk fermentation. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 866-874. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.108>

NGUYEN, T. M. P; LEE, Y. K.; ZHOU, W. (2009). Stimulating fermentative activities of bifido bacteria in milk by high intensity ultrasound. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 6-7, p. 410-416. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.02.004>

O'BRIEN, J. M.; MORRISEY, P. A. (1989). The Maillard reaction in milk products. **Bulletin of International Dairy Federation**, v. 238, p. 53-61.

OLIVEIRA, C. A. F.; MESTIERI, L.; SANTOS, M. V.; MORENO, J. F. G.; SPERS, A.; GERMANO, P. M. L. (2000). Effect of microbiological characteristics of raw milk on the quality of whole milk powder. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n.2, p. 95-98. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822000000200006>

PEREIRA, P. C. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, v. 30, n. 6, p. 619-627. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>

PERRONE, I. T.; SIMEÃO, M.; JÚNIOR, P. H.; STEPHANI, R.; CARVALHO, A. F. (2013). A influência das condições de operação em spray dryer piloto sobre a umidade e a atividade de água do leite emp ó integral. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 393, p. 5-9. DOI: <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20130029>

PINGRET, D.; TIXIER, A.S.F.; CHEMAT, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 593-606. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.039>

POVEY, J. W.; MASON, T. J. **Ultrasound in Food Processing**. Oxford: Springer, 1998.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1-7, 2010.

RAO, M.A., DATTA, A.K. e RIZVI, S.H. **Engineering Properties of Foods**. 3 ed. Flórida: CRC Press Taylor e Francis Group, 2005. p. 239-326.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Estratégia Experimental para fatoriais fracionados e delineamento composto central rotacional (DCCR). In: RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 3 ed. Campinas: Editora Casa do Pão, 2005. Cap. 5, p. 135- 228.

ROOS, Y. H. (2002). Importance of glass transition and water activity to spray drying and stability of dairy powders. *LeLait Dairy Journal*, v. 82, n. 4, p. 475-484. DOI: <https://doi.org/10.1051/lait:2002025>

SAFFARI, M.; LANGRISH, T. (2014). Effect of lactic acidin-process crystallization of lactose/protein powders during spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 137, p. 88-94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.04.002>

SHANMUGAM, A.; CHANDRAPALA, J.; ASHOKKUMAR, M. (2012). The effect of ultrasound on the physical and functional properties of skim milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, n. 251-258. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.06.005>

SHAKEEL-UR-REHMAN; FARKYE, N. Y; SCHAFFNER, A. A. (2003). The effect of multiwall Kraft paper or plastic bags on physico-chemical changes in milk powder during storage at high temperature and humidity. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 1, p. 12-16.

SINGH, H.; YE, A. (2010). Controlling milk protein interactions to enhance the reconstitution properties of whole milk powders. **Dairy Science and Technology**, v. 90, n. 2-3, p. 123–136. DOI: <https://doi.org/10.1051/dst/2009038>

SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science e Technology**, v. 21, n. 7, p.323-331. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>

STAPELFELDT, H.; NIELSEN, B. R.; SKIBSTEDA, L. H. (1997). Effect of heat treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 5, p. 331-339. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00016-2)

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. (2006). Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e a acrescentadas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**, v.26, n.3, p.589-595. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000300017>

THOMAZ, M.E.C.; SCHER, J.; DESOBRY-BANON, S.; DESOBRY, S. (2004). Milk Powders Ageing: Effect on Physical and Functional Properties. **Critical Reviews in**

Food Science and Nutrition, v.44, n. 5, p.297–322. DOI:
<http://doi.org/10.1080/10408690490464041>

THOMSEN, M.; LAURIDSEN, L.; SKIBSTED, L. H.; RISBO, J. (2005). Temperature effect on lactose crystallization, Maillard reactions, and lipid oxidation in whole milk powder. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 18, p. 7082-7090. DOI: <http://www.doi.org/10.1021/jf050862p>

VALIK, L.; MEDVEDOVÁ, A.; LIPTÁKOVÁ, D. (2008). Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG in milk at suboptimal temperatures. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 47, n. 2, p. 60-67.

VITALI, A.A.; TEIXEIRA NETO, R.O.; GERMER, S.P.M. Testes acelerados de vida-de-prateleira de alimentos. In: MOURA, S.C.S.R; GERMER, S.P.M. (Coord.). **Reações de transformação e vida-de-prateleira de alimentos processados**. 3 ed. Campinas: ITAL, 2004. cap. 3, p. 75-81.

YANJUN, S.; JIANHANG, J.; SHUWEN, Z.; HONGJUAN, L.; JING, L.; LU, L.; UKULO, H.; YANLINH, S.; WENMING, G.; WUPENG, G.; JIAPING, L. (2014). Effect of power ultrasound pre-treatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 11-18.

WESTERGAARD, V. **Milk Powder Technology Evaporation and Spray Drying**. Copenhagen: Niro A/S, 2004. 338 p.

WU, H.; HULBERT, G. J.; MOUNT, J. R. (2001). Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. **Innovative Food Science e Emerging Technologies**, v.1, n. 3, p. 211-218. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00020-5)

ZAMANIPOOR, M.H.; MANCERA, R.L. (2014). The emerging application of ultrasound in lactose crystallisation. **Trends in Food Science e Technology**, v. 38, n. 1, p. 47-59. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.04.005>

ZISU, B.; SCHLEYE, M.; CHANDRAPALA, J. (2013). Application of ultrasound to reduce viscosity and control the rate of age thickening on concentrated skim milk. **International Dairy Journal**, v. 31, n. 1, p. 41-43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.04.007>